



# THÈSE

En vue de l'obtention du

## DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ DE TOULOUSE

Délivré par :

Université Toulouse 3 Paul Sabatier (UT3 Paul Sabatier)

---

**Présentée et soutenue par :**

**Yirajen VUDDAMALAY**

**le** 21 novembre 2014

**Titre :**

Lymphocytes T régulateurs CD8+CD28low:  
Différenciation et rôle dans l'asthme allergique

---

**École doctorale et discipline ou spécialité :**

ED BSB : Immunologie

**Unité de recherche :**

INSERM UMR1043 CPTP

**Directeur(s) de Thèse :**

Prof. Joost van MEERWIJK

**Jury :**

Prof. Denis HUDRISIER  
Dr Ignacio ANEGON  
Dr Bruno LUCAS  
Dr David DOMBROWICZ  
Prof. Joost van MEERWIJK

Président  
Rapporteur  
Rapporteur  
Rapporteur  
Directeur de thèse

*‘I did it for me. I liked it. I was good at it. And I was really—I was alive...’*

Walter White  
Series Finale of Breaking Bad

## Remerciements

Je n'ai jamais aimé les études. Apprendre pour être évalué est un concept qui m'a tout le temps échappé. Einstein disait que nous sommes tous des génies mais que si vous jugez un poisson sur ses capacités à grimper à un arbre, il passera sa vie à croire qu'il est stupide. Je pense que cette citation résume très bien ma vision du système d'éducation mauricien. Certes je n'aimais pas étudier mais j'aimais apprendre des nouvelles choses et comme wikipedia (ou même l'internet) n'existait pas encore à mon époque, je n'ai pas eu d'autres choix que de faire des études. Et au cours de ces vingtaines d'années passées sur les bancs de l'école, du collège et de la fac, j'ai eu l'extrême privilège et la chance de rencontrer des personnes qui m'ont instruit, éduqué, aidé et soutenu. Aujourd'hui, ceux sont ces gens que je voudrais remercier du fond du cœur car sans eux, cette thèse n'aurait pas vu le jour et quelque part sans eux, tout ceci n'aurait pas valu la peine.

Je voudrais donc commencer par remercier Joost, mon directeur de thèse pour m'avoir accueilli dans son laboratoire et pour m'avoir soutenu (et supporté) pendant ces cinq années passées au CPTP. Je me souviens de notre première rencontre un jeudi après-midi après le cours magistral d'immunologie où vous m'avez convaincu de poursuivre mes études en M2 dans ce domaine. Je garde un très bon souvenir de nos discussions philosophiques sur le développement des lymphocytes T (même si tout le monde sait que c'est stochastique!), de la science et de la vie en général. Votre supervision, vos conseils et votre influence ont fait de moi le chercheur que je suis aujourd'hui et je vous en serai éternellement reconnaissant. Je n'oublie pas également que vous m'avez promis de mettre une cravate pour un certain événement et nous en avons maintenant une preuve écrite.

Je remercie également Paola pour son soutien et son aide au cours de mon M2R et de ma thèse. Vos conseils et suggestions m'ont beaucoup aidé pour mettre en place les différents axes de recherche de mon projet de thèse. En effet, grâce à vous j'ai appris en autres les subtilités de la cytométrie en flux. Votre vision élégante de la science m'a beaucoup marquée et inspirée. Merci également pour les chocolats achetés à la boutique hors-taxe de l'aéroport parce qu'avec Joost ce n'était pas gagné. Finalement je voulais vous remercier vous et Joost pour m'avoir invité chez vous maintes fois. Les fous rires pendant ces soyrays étaient mémorables.

Merci à Céline Pomié, mon mentor, celle qui m'a tout appris, notamment que les pruneaux ne poussaient pas dans les arbres mais étaient en fait des prunes séchées. Ton encadrement et tes conseils m'ont aidé à surmonter cette grande épreuve qu'est le M2R. Je te remercie également pour ta patience dont t'as fait preuve parce qu'avec moi ce n'était pas facile tous les jours.

Merci à Geneviève pour son aide et son travail au quotidien. Avec vous j'ai appris les secrets de la microbiologie et la biologie moléculaire. La mise en place des différentes lignées de souris a été très difficile mais nous y sommes quand même arrivés.

Au tour des autres membres de l'équipe Tolérance et Autoimmunité (futur T cell mediated immune tolerance) maintenant :

A Nicolas, merci pour ta bonne humeur, tes blagues, d'avoir partager tes découvertes 'intéressantes' sur internet, ton optimisme, ton obsession pour TIGIT et ton aide pour les manips. Je te souhaite pleins de bonnes choses pour ton Post-Doc aux States.

A Mehdi, mon collègue de bureau et ancien stagiaire, merci pour les biscuits LU, ta bonne humeur, pour les vidéos sur youtube, les chorégraphies improvisées à 20h. Je te souhaite beaucoup de succès, que ton verre de coca/oasis soit toujours plein et que Jeffrey (ou une stagiaire) soit toujours là pour te remettre des glaçons.

A Julie (low) notre dernière recrue, comme tu peux voir j'ai pu finir ma présentation de soutenance. Merci de n'avoir mis la pression pendant mes derniers jours de thèse, pour tes madeleines et pour la bonne ambiance dans notre bureau.

A Béné, merci de m'avoir accompagné lors de mes pas de danse de samba (Tututu tututudu), pour ta bonne humeur, les vidéos dossiers et tes blagues. Je te souhaite de percer les mystères de l'épigénétique le tout en dansant et en buvant des binousses.

A Véro, notre mère à tous, merci de nous rappeler au quotidien qu'il n'y pas que l'immuno dans la vie, il y a l'épigénétique aussi. Certes nous n'avons pas partager de bureau, mais t'as su partager ta bonne humeur avec tout le labo. J'espère qu'on aura à nouveau l'occasion de partager une bonne vodka et que d'ici là tu ne vas pas faire une overdose de Frozen.

A Olivier, ton enthousiasme et ton franc-parler a eu l'effet d'une boisson survitaminée dans cette équipe. Merci pour ton aide, tes conseils et suggestions durant cette dernière année de thèse.

A Agathe, que j'ai moins connue, je suis content que t'as pu finalement (après maintes péripéties) rejoindre l'équipe des Joffrettes et je te souhaite tout le meilleur pour la suite.

Aux anciens membres, Lise, Clémence, Jean-Yves et Andry, merci pour votre soutien et votre bon humeur tout le long de mon stage M2R et de ma thèse.

N'oublions pas les stagiaires qui ont eu la folie de vouloir travailler avec moi :

A Marjolène Straube aka Straubie, je regrette qu'on n'ait pas pu te convaincre de faire une thèse mais j'espère que tu seras épanouie dans ton travail. Merci pour les verres de mojitos à la plage (tu m'en dois encore quelques uns), les gâteaux au chocolat (enfin non pas merci) et la tasse Marvel. A chaque fois que je passe devant ta rue sur Saint-Michel, je pense à toi.

A Hélène Floquet aka Robin, nous avons pas mal fait avancer le sujet sur l'asthme allergique grâce à toi et pour cela je te remercie. Je te souhaite pleins de bonnes choses en tant qu'enseignante. J'espère qu'on pourra finalement aller boire ce coup à la plage.

A Sokchea, lorsqu'on nous t'avons accueilli dans cette équipe, tu venais de quitter ton pays et tu avais du mal à t'exprimer dans la langue de Molière. Mais en quelques mois, tu as su faire preuves de beaucoup de courage, d'efforts et de détermination pour réaliser un excellent projet de stage (comme le démontrent tes notes). Merci pour ta grande gentillesse et le nombre incalculable de gâteaux que tu as ramenés au labo.

A Marine (Gros ou le Gros selon les humeurs), même si je t'ai pas encadrée directement, je tiens à dire que ta enthousiasme, ton obsession pour les dinosaures et les canards et tes expressions bizarres ont mis une très bonne ambiance dans le bureau. Je te souhaite de finalement fêter Noël au Brésil et du succès pour ta carrière de chercheur (A priori c'est bien parti)

A Julie (High), ma dernière stagiaire. Tes oufs et poufs ont contribué à faire de mes derniers mois au sein de ce labo un peu moins triste. Merci pour ta précieuse aide pendant les manips, les gâteaux et les punchs. J'espère que ton court séjour parmi nous t'a convaincu de continuer en immuno.

Finalement à Cécile qui reprend mon travail, je te souhaite de porter les Treg CD8<sup>+</sup> au summum de leur gloire et de profiter pleinement de ta thèse dans cette équipe.

Merci également à Marion, Julie L et Aude.

En ce qui concerne les autres personnes que j'ai côtoyé au sein du CPTP :

A Sylvie, ma marraine de thèse. Merci pour vos précieux conseils et votre soutien au cours de ces quatre années de thèse.

Merci également aux équipes du Bat A, B et F : Nicolas F, Assia, Jeremy, Svet, Antoine, Jean-Charles, Lucette, Laure, Sophie, Magali, Pascal, l'autre Jeremy, Maeva, Nicolas B, Alf, Gilles, Monica, Anna, Nestor, Julia, Virginie V, Abdel, Sahar, Daniel, Charlotte (Mimi), Cécile M, Salvatore, Sabina, Roxanna, Loic, Eric.

Je tiens à remercier Virginie F pour les fous rires en P2, les manip galères étaient quand même rigolos avec toi. Merci pour les cupcakes aussi.

Aux plateaux de cytométrie et d'histologie, Fatima, Valérie, Anne-Laure, Delphine et Florence. Merci beaucoup pour votre aide et votre disponibilité. Sans vous, ce travail ne serait pas autant abouti.

A Cécile Demeur, merci beaucoup pour votre soutien et vos conseils pendant mon monitorat. Merci également pour les banoffees !

A Nicolas Gaudenzio. Merci pour tes conseils, tes blagues et ta bonne humeur pendant mes années de monitorat.

A Denis Hudrisier. Vous êtes à l'origine de ma passion pour l'immunologie. En effet, au début de ma L3, je ne savais pas trop dans quel domaine me spécialiser. Tout cela a changé au cours du deuxième semestre. J'admire la pédagogie et l'implication dont vous faites preuves lors de vos enseignements. Merci pour vos conseils, votre soutien et votre influence tout le long de mon parcours universitaire.

Merci aux autres membres de l'équipe pédagogique d'immunologie Claire, Jérôme, Fanny, Christophe, Lilian et Charline.

Aux gens qui ont fait la guerre... euh non le M2R avec moi. J'en garde de très bons souvenirs de ces huit mois passés ensemble.

A Caro aka Roo, Merci de soutien et de ta bonne humeur. Merci pour les covoiturages, les soyrays à La Plage. J'espère qu'un jour nos enfants respectifs iront à l'école ensemble. Merci également à Nicolas aka bichette pour ses blagues et sa bonne humeur.

A Johan aka Yohan, Merci pour tes blagues, nos conversations sur la science-fiction et tes crumbles sans chocolat.

A Laurent aka Lolo, Merci pour tes blagues. Avec toi nous complétons les quatre fantastiques (ou l'élite).

A Liliana aka Little Italia, même si tu n'as pas fait le master avec nous, dans mon cœur tu es des nôtres. Merci pour ta joie de vivre, tes erreurs en français, ta bonne humeur et ton sourire au quotidien.

Merci à Sébastien, Aneli, Benji et Aurore

Merci à Jeni to the fer (renard), Cécile (charogne), Anne (boulette de riz), Aurélie (lémurien) pour les bons moments passés ensemble.

Sur un plan plus personnel je voudrai remercier chaleureusement les personnes suivantes :

A Mariavah aka Bibi, sans toi tout ceci ne sera pas possible. Sans toi, je me serai arrêté il y a bien des années. Merci pour m'avoir soutenu pendant les années fac, de m'avoir filé tes fiches quand je venais pas en cours, d'avoir été là quand ça n'allait pas, d'avoir fait soyrays sur soyrays avec moi, de m'avoir invité chez toi et à ton mariage. Merci pour tes conseils et tes succulents repas. J'espère que le rêve de l'entreprise Rodlay verra éventuellement le jour. Je ne pourrai jamais te remercier suffisamment pour avoir été là durant tous ces années. Je te souhaite d'être heureuse dans la vie.

Merci également à Yohan, pour les soyrays hallucinantes, ses blagues, ses chansons paillardes, les différents trucs que nous avons piqué au resto et sa disponibilité.

A Céline aka Chouchou, merci d'avoir été là depuis le M2R. Ton soutien m'a permis d'achever cette thèse. Merci pour tout ce que t'as fait pour moi. Je t'en suis éternellement reconnaissant. Je te souhaite pleins de succès dans ta nouvelle aventure.

A Vanessa aka Catwoman, merci de m'avoir accueilli chez toi à Toulouse et sur Paris. Merci pour ta bonne humeur et ton sourire. J'admire le courage dont t'as fait preuves dans tout tes moments galères. Merci pour les pancakes à 2h du mat, les réveils en douceur et les séances GoldenEye. Merci de trouver du temps pour me voir à chaque fois que je suis sur Paris.

Merci également à Janos, my BFF. Merci pour les comics, tes blagues, nos conversations sur la science-fiction et nos repas de dingues. Je vous souhaite à vous deux une très belle vie ensemble (avec le chat aussi).



A Céline aka Ariel aka Red, merci pour ton soutien et tes conseils. Merci pour les marathon Marvel et Lethal Weapon, pour les soyrays OMG remplies de dossiers. Merci de venir me voir aussi souvent, de plonger dans une piscine avec moi à minuit, de danser avec moi, d'apprécier ma cuisine, de continuer à boire avec moi quand tous les autres sont bourrés. S'il existe un moyen je viendrai à toi. Toujours je te retrouverai même lorsque le monde et les flammes et la fin de toute chose nous sépareront.

A Christelle aka Dude, merci de m'avoir soutenu pendant mes années facs. Pou ou Mamzelle, Koué mi fré pas ou ton sourire.

Je remercie également Amélie (kitty) Artiguelongue pour son soutien, ses blagues pas toujours drôles et sa bonne humeur. Merci pour les cinés, les restos, les cartes postales de geek, les derniers verres à la plage qui finissent à 4h du mat en pleine semaine. Merci également pour les paquets de bonbon customisé à outrance. J'espère que t'as surmonté la traumatisante nouvelle que hello kitty n'est pas un chat (OMG!!).

A Nathalie, my dearest and oldest french friend. Merci pour ton soutien, ta maîtrise approximative de ma langue maternelle, les Dr Pepper, les cadeaux, les repas et tout le reste. No this is not goodbye, its just a new beginning.

A leslie aka lesloou, ma chère amie. Merci pour les cinés, les restos, les soyrays, les magners, les nan kebabs, les derniers verres à la Laplage, les dejeuners chez tes parents. Je te souhaite pleins de bonnes choses pour ta vie de jeune thésarde.

A Maude aka le Rat. Merci d'avoir fait un bout de chemin avec moi et de m'avoir soutenu lors de ma thèse. Merci pour les cinés, les restos, les fou-rires, les dessins de panda, les albums de Clavin et Hobbs et les winter is coming. At the beginning of everything, the atoms that make up your soul and I were in so close proximity that in this life and in the others we'll always be drawn towards each other. All of versions of me love all versions of you.

A BB Hélène... BB Hélène aka rat divin. Merci pour ta gentillesse et ton sourire. Merci de trouver du temps pour me voir à chaque fois que t'es là. Ta divinité a illuminé nos soyrays. J'espère que nous mettrons fin au règne du Roi Rat afin de réinstaurer notre suprématie sur le royaume.

Merci à Manon (Boubou), Aurélien (Bougeoir), Manon (Poney), Thomas (Ecu), Florence et Marc pour les soyrays mémorables.



A mes chers compatriotes mauriciens d'ici et d'ailleurs, Sok, Labrize, Roshni, Davina, Mauréna, Ravi, Ithuutu, Seero, Mervin, Moa, Douglas, Vins, Tintin, Bibi, Bhups, Moujib, Manish, Kevin, Neha, Gaston, Mr Youvin, Vani, Seeree, Bindah, Wifey Merci pour nos mémorables soy-rays et votre éternel soutien.

Aux Frenchies, Lejeune, Leblond, Maud, Manon, Anne, Julien, Clara, Valentine, Tinou, Thomas, Patrick, Stephane, Isa, Freckles, Bijou, Sophie, Olivier, Cécile et Lucie merci pour les repas, les gâteaux, les soy-rays OMFG, les bons moments passés ensemble, votre soutien et votre bonne humeur. Avec vous j'ai kiffé toutes ces années passées sur Toulouse.

Merci à Madame Pelata, Ziane et Aboubillah pour l'avoir donné du travail ce qui m'a permis de financer toutes ces années d'études.

Aux différentes familles à l'île Maurice Vuddamalay, Chellen, Subbarayen, Narayenen, Pillay, Appavoo, Seebaluck et Sewraz, à mes oncles, tantes, cousins et cousines, je vous remercie de votre soutien et pour les bons moments passés en votre compagnie. We are and will remain family.

A mes parents Krishna et Uma, qui ont tout sacrifié pour que leurs deux enfants accèdent à une bonne éducation et qu'ils me manquent de rien. Vous qui aviez trimé pendant des années et des années, traversé galères sur galères, je suis fier d'être votre fils et je suis reconnaissant pour tous les efforts que vous avez fait pour moi et Alvin.

Finalement, à mon frère Alvin, my brother from the same mother, my partner in crime, the only man I have ever loved, the Mario to my Luigi, the Jessie to my Walter, the Laurel to my Hardy, the Chewie to my Han, the Jarvis to my Tony, the Joey to my Chandler. Merci à toi qui m'a soutenu durant ces nombreuses années. So if by the time the bar closes and you feel like falling down, I'll carry you home tonight brother.

A tous ceux que j'ai cités et à ceux que j'ai malheureusement oubliés, je vous remercie encore une fois d'avoir été là pendant les bons moments et les galères. Je vous souhaite d'être heureux dans la vie, d'aimer ce que vous faites et de faire ce que vous aimez. Mon français ne sera jamais assez bon pour vous dire à quel point je suis reconnaissant et heureux de vous avoir rencontrés. Merci. Mo contan zot.

*'Regrets I have a few but yet again too few to mention...'*

Frank Sinatra  
My way

# Sommaire

## Résumé

## Liste des illustrations

## Liste des abréviations

## Introduction

### I-Développement des lymphocytes T ..... 21

1. De la cellule souche aux progéniteurs thymiques précoces
2. Road to the thymus
3. Choix du lignage T
4. La sélection- $\beta$
5. La sélection positive
6. Rôle des cTEC dans la sélection positive
7. Le choix de lignage CD4/CD8
  - a. Le modèle stochastique.
  - b. Le modèle instructif basé sur la force du signal
  - c. Le modèle instructif basé sur la durée du signal
  - d. Le modèle cinétique (non-classique)
  - e. Rôle des enhanceurs E8 dans le choix du lignage
  - f. Facteurs de transcription impliqués dans le choix de lignage
8. La sélection négative
9. Les mécanismes de tolérance centrale
  - a. La délétion clonale
  - b. L'anergie
10. Les cellules médullaires impliquées dans la sélection négative
  - a. Les cellules épithéliales médullaires
  - b. Les cellules dendritiques de la médulla
11. La sortie des LT du thymus

### II-La tolérance périphérique ..... 43

1. La tolérance récessive
  - a. L'ignorance des complexes CMH-peptide du soi

- b. L'anergie
  - c. La délétion
  - d. La déviation immune
2. Les acteurs de la tolérance récessive
- a. Les DC tolérogènes
  - b. Les cellules stromales des nœuds lymphatiques

### III- La tolérance dominante ..... 47

1. From the 'S' word to the 'R' word
2. Les Treg CD4<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>
  - a. De la souris scurfy au syndrome IPEX
  - b. Foxp3 : LE facteur de transcription des Treg CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>
  - c. Développement thymique des Treg Foxp3<sup>+</sup>
  - d. Facteurs impliqués dans la différenciation des Treg Foxp3<sup>+</sup>
  - e. Développement extrathymique de Treg Foxp3<sup>+</sup>
  - f. Mécanisme d'action de Foxp3
  - g. Régulation de l'expression de Foxp3
  - h. Rôle des Treg CD4<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> en physio(patho)logie
  - i. Mécanismes d'action des Treg Foxp3<sup>+</sup>
3. Les Treg CD8<sup>+</sup>
  - Les Tregs CD8<sup>+</sup>CD122<sup>high</sup>
  - Les Tregs CD8<sup>+</sup> restreints à Qa-1
  - Les Treg CD8<sup>+</sup>CD103<sup>+</sup>
  - Les Tregs CD8<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>
  - Les Treg CD8<sup>+</sup>CD11c<sup>+</sup>
  - Les Treg CD8<sup>+</sup> HLA-G<sup>+</sup>
  - Les Treg CD8<sup>+</sup>CD45RO<sup>+</sup>
  - Les Treg CD8<sup>+</sup>CD45RC<sup>low</sup>
  - Les Treg CD8<sup>+</sup>αα<sup>+</sup> intestinaux
  - Les Treg CD8<sup>+</sup>CD28<sup>neg</sup>
  - Les Treg CD8<sup>+</sup>CD28<sup>low</sup> murins
4. Les autres populations de lymphocytes régulateurs
  - Les Tr1
  - Les iNKT
  - Les LTγδ
  - Les lymphocytes B régulateurs (Breg)
  - Les cellules dendritiques tolérogènes (Tol-DC)
  - Les myeloid-derived suppressor cells (MDSC)

**III-Rôle de Aire dans l'induction de tolérance ..... 68**

Introduction

1. Aire et l'expression de TSA

2. Fonctions de AIRE dans la tolérance centrale

*a. Rôle de AIRE dans la sélection négative*

*b. AIRE et la migration des thymocytes et des cellules dendritiques*

*c. Aire et la maturation des mTEC*

*d. Aire et le développement de nTreg*

3. Rôle de Aire en périphérie

**IV- L'asthme allergique ..... 75**

1. Déclenchement de l'asthme allergique

*a. La sensibilisation à l'allergène*

*b. Les facteurs génétiques*

*c. Les facteurs environnementaux.*

*d. L'activation de l'épithélium*

*e. Molécules sécrétées par l'épithélium*

*f. Activation des cellules dendritiques*

*g. Recrutement des LT au niveau du poumon*

2. Rôle des cellules immunitaires innées dans l'asthme

*Les mastocytes*

*Les basophiles*

*Les éosinophiles*

*Les neutrophiles*

*Les « innate lymphoid cells » de type 2*

3. Rôle des cellules du système immunitaire adaptative dans l'asthme

*a. Les LT CD4<sup>+</sup>*

*b. Les lymphocytes T  $\gamma\delta$*

*c. Les NKT*

4. Rôle des Tregs dans l'asthme

*Les Treg CD4<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>*

*Les Tr1*

5. Rôle des LT CD8<sup>+</sup> dans l'asthme allergique

*Les LT CD8<sup>+</sup> conventionnels*

*Les LT CD8<sup>+</sup> régulateurs*

RÉSULTATS.....	91
Objectifs	
Discussion et perspectives .....	94
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	101

### **Lymphocytes T régulateurs CD8<sup>+</sup>CD28<sup>low</sup>: Différenciation et fonction dans l'asthme allergique**

Directeur de thèse : Prof. Joost van Meerwijk

Toulouse, le 21 novembre 2014

Les lymphocytes T régulateurs (Treg) jouent un rôle essentiel dans le contrôle des réponses immunitaires. A travers différents mécanismes effecteurs, les Treg contribuent au maintien de l'homéostasie immunitaire et à la *tolérance* au soi. Plusieurs populations de Treg ont été identifiées, dont celle qui est caractérisée par l'expression du co-récepteur CD8 et de faibles niveaux de la molécule de co-stimulation CD28. Les Treg CD8<sup>+</sup>CD28<sup>low</sup> murins ont une capacité suppressive *in vitro* et préviennent l'immunopathologie dans différents modèles expérimentaux *in vivo*. Cependant l'origine et le rôle physiologique de ces cellules restent à ce jour inconnu. Les Treg peuvent soit se développer en tant que lignage distinct dans le thymus à partir de précurseurs hématopoïétiques issus de la moelle osseuse soit se différencier à partir du pool de lymphocytes T conventionnelles en périphérie. Selon leur origine, les Treg exercent des fonctions distinctes lors des réponses immunitaires. Ici nous démontrons que des Treg CD8<sup>+</sup>CD28<sup>low</sup> fonctionnels sont présents dans le thymus de la souris et que ces cellules se développent *de novo* dans cet organe et ne recirculent pas de la périphérie. Nous présentons également l'identification, dans le sang et le thymus humain, une population homologue de lymphocytes T CD8<sup>+</sup>CD28<sup>low</sup> naïfs pourvue d'une capacité immunosuppressive.

Nous avons évalué l'implication des Treg CD8<sup>+</sup>CD28<sup>low</sup> dans le contrôle des réponses immunitaires. Nous avons généré des souris présentant une ablation spécifique de l'IL-10, une molécule cruciale au maintien de l'homéostasie immunitaire au niveau des muqueuses, dans les lymphocytes T CD8<sup>+</sup>. Dans un modèle expérimental d'asthme allergique, ces souris développent une inflammation pulmonaire accrue démontrant le rôle d'un ou plusieurs populations de Treg CD8<sup>+</sup> producteurs d'IL-10 dans le contrôle des réponses immunitaires au niveau des voies aériennes. Le transfert adoptif de Treg CD8<sup>+</sup>CD28<sup>low</sup> issus de souris sauvages suffit à restreindre la réponse allergique.

En conclusion, nos données mettent en évidence l'origine thymique des Treg CD8<sup>+</sup>CD28<sup>low</sup> et démontrent leur implication dans le maintien de l'homéostasie immunitaire au niveau des poumons. L'évaluation du rôle des Treg CD8<sup>+</sup>CD28<sup>low</sup> dans l'immunopathologie apportera une meilleure compréhension de la fonction physiologique de ces cellules et contribuera ultérieurement au développement de thérapies utilisant ou ciblant ces cellules.

Yirajen Vuddamalay

### **CD8<sup>+</sup>CD28<sup>low</sup> regulatory T cells: Differentiation and function in allergic asthma**

PhD supervisor: Prof. Joost van Meerwijk

Toulouse, 21<sup>st</sup> November 2014

Regulatory T cells (Treg) play a central role in the control immune responses. Their multifaceted action contributes to the maintenance of immune self-tolerance and homeostasis. Expression of the CD8 co-receptor and low levels of the co-stimulatory molecule CD28 characterizes one of the several Treg populations identified. CD8<sup>+</sup>CD28<sup>low</sup> Treg from mice exert suppressive function *in vitro* and control experimental immunopathology *in vivo*. However the origin and physiological role of these cells have remained unclear up till now.

Treg can either develop in the thymus from bone-marrow-derived hematopoietic precursors or differentiate from the pool of conventional T cells in the periphery. Depending on their origin, Treg play distinct roles in immune responses. We have demonstrated that in mouse, functional CD8<sup>+</sup>CD28<sup>low</sup> Treg are present in the thymus and that these cells develop locally and are not recirculating from the periphery. We also identified a homologous naïve CD8<sup>+</sup>CD28<sup>low</sup> T cell population with immunosuppressive properties in human peripheral blood and thymus.

We then evaluated the physiological relevance of CD8<sup>+</sup>CD28<sup>low</sup> Treg in the control of immune responses. We used a conditional knockout approach to generate mice bearing specific ablation of IL-10, a key molecule involved in the maintenance of immune homeostasis at mucosal surfaces, in CD8<sup>+</sup> T cells. In an experimental model of asthma, these mice developed exaggerated airway inflammation demonstrating the role of one or several IL10-producing CD8<sup>+</sup> Treg populations in the control of airway responses. Importantly, adoptive transfer of IL10-proficient CD8<sup>+</sup>CD28<sup>low</sup> Treg was sufficient to restrain the allergic reaction.

Investigating the relevance of thymus-derived CD8<sup>+</sup>CD28<sup>low</sup> Treg in immune-mediated pathologies will eventually lead to a better comprehension of the physiological role of these cells and possible cell-based therapeutics.



## Liste des illustrations

---

- Figure 1      Stade de différenciation des précurseurs hématopoïétiques issus de la moelle osseuse en lymphocytes T
- Figure 2      Le modèle stochastique du choix de lignage CD4/CD8
- Figure 3      Le modèle instructionnel du choix de lignage CD4/CD8 basée sur la force du signal
- Figure 4      Le modèle instructionnel du choix de lignage CD4/CD8 basée sur la durée du signal
- Figure 5      Le modèle cinétique du choix de lignage CD4/CD8
- Figure 6      facteurs de transcription et facteurs environnementaux impliqués dans le choix de lignage CD4/CD8
- Figure 7      Migration des thymocytes lors de la thymopoïèse
- Figure 8      Mécanismes de tolérance périphérique
- Figure 9      Mécanismes suppresseurs des Treg CD4<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>
- Figure 10     Les domaines protéiques de AIRE, ses partenaires clés et le mécanisme d'induction de l'expression de TSA.
- Figure 11     Rôle de AIRE dans la tolérance centrale et périphérique
- Figure 12     Les différents acteurs de la réponse allergique
- Figure 13     Gènes de susceptibilité à l'asthme allergique
- Figure 14     Initiation et propagation de la réponse Th2 lors de l'asthme allergique

## Liste des abréviations

---

AICD	Activation Induced Cell Death
AIRE	autoimmune Regulator
AHR	airway hyperreactivity
APC	antigen Presenting cell
APECED	autoimmune polyendocrinopathy candidiasis ectodermal dystrophy
BAFF	B-cell-activating factor of the TNF family
Breg	lymphocyte B régulateurs
CLP	common lymphoid progenitors
CSH	cellules souches hématopoïétiques
CMH	complexe majeure d'histocompatibilité
cTEC	cellule épithéliale corticale
CTLA-4	cytotoxic T lymphocyte antigen 4
DC	cellule dendritique
DN	double-négatif
Dnnt	deoxynucleotidyltrans-ferase
DP	double-positif
EAE	encéphalomyélite autoimmune expérimentale
EBF1	early B cell factor
ETP	early thymic progenitors
Foxp3	forkhead box P3
GFP	Green fluorescent Protein
GM-CSF	granulocyte macrophage colony-stimulating factor
GVHD	graft versus host disease
HLA	human leukocyte antigen
ICAM	intracellular cell adhesion molecule
IDO	indoleamin 2,3-dioxygenase
IEL	lymphocytes intraépithéliaux
IFN	interféron
IL	interleukine
iNKT	invariant NKT
ITAM	immunoreceptor tyrosine-based activation motifs
IPEX	immune dysregulation polyendocrinopathy enteropathy X linked syndrome
LAP	latency associated protein
Lck	leukocyte specific protein tyrosine kinase
LT	lymphocyte T
MAPK	Mitogen Activating protein kinase
MBP	myelin basic protein
MINK	NIK-related misshapen-like Kinase
MOG	myelin oligodendrocyte glycoprotein
mTEC	cellules épithéliales thymiques médullaires
NF-κB	nuclear factor Kappa B
NK	Natural Killer
NKT	Natural Killer T cell
OVA	ovalbumine
PAMP	pathogen associated molecular patterns
PBMC	peripheral blood mononuclear cells
PD1	Programmed Cell Death 1
PDL1	program death ligand
PRR	pattern recognizing receptor
RAG	recombinant activation gene

Runx	runt-related transcription factor
SIP	sphingosine-1-phosphate
STAT	signal transducers and activators of transcription
TAP	transporter associated with antigen processing
TCR	T cell receptor
TGF- $\beta$	transforming growth factor beta
Th-POK	T helper-inducing POZ-Krüppel factor
TLR	Toll-like receptor
TOX	Thymus high-mobility group box protein
Treg	lymphocyte T régulateur
TSLP	thymic stromal lymphoprotein
TSP	thymus settling progenitors
TSSP	thymic specific serine protease
$\gamma$ c	chaîne commune $\gamma$

# **INTRODUCTION**

## *I-Développement des lymphocytes T*

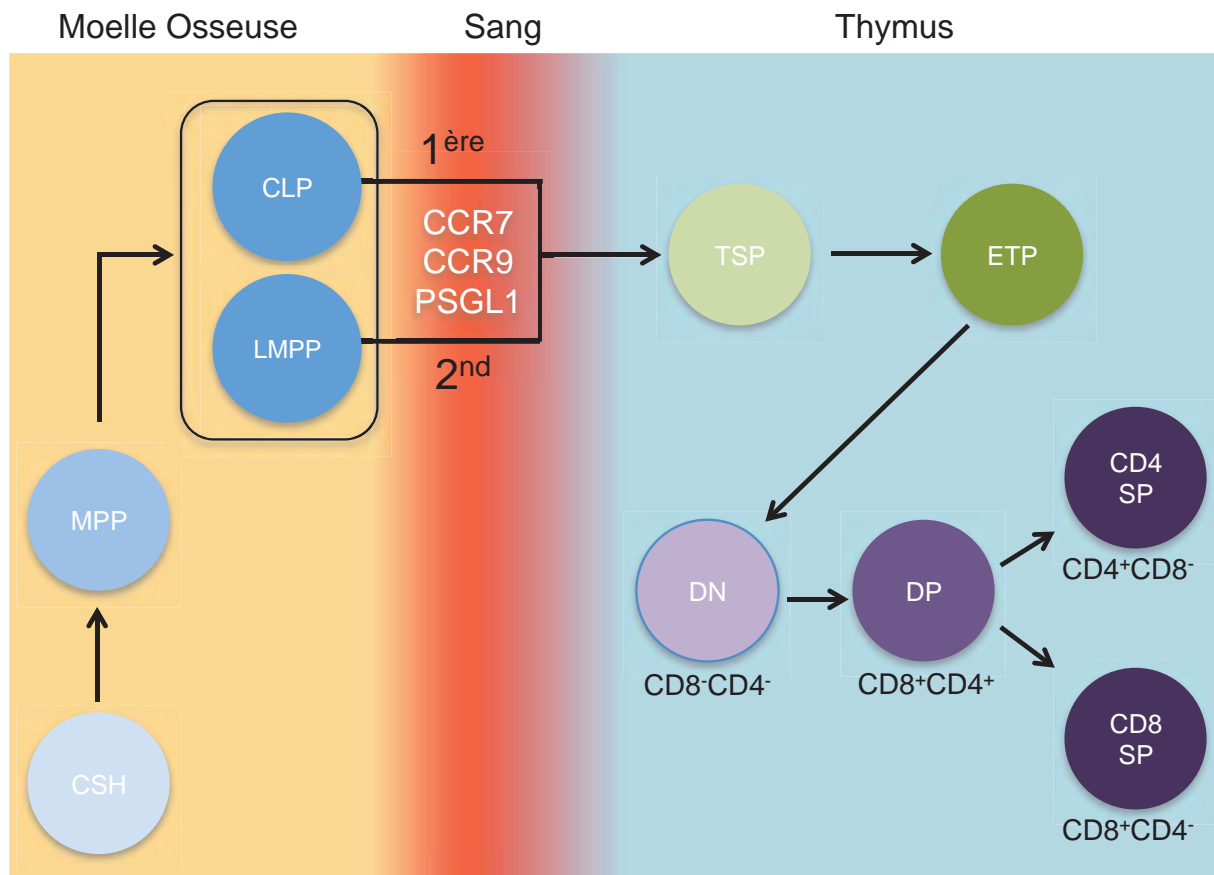
La majorité des lymphocytes T se développe au niveau d'un organe lymphoïde spécialisé, le thymus. Vu que les cellules qui résident dans cet organe ne s'auto-renouvellent pas, la thymopoïèse nécessite le recrutement continu de précurseurs hématopoïétiques qui dérivent des cellules souches de la moelle osseuse chez l'adulte ou du foie fœtal lors de l'embryogenèse.

### *1. De la cellule souche aux progéniteurs thymiques précoces*

Au niveau de la moelle osseuse, on distingue deux populations de cellules souches hématopoïétiques (CSH) : les CSH à longue durée de vie caractérisées par le phénotype  $\text{lin}^- \text{ckit}^+ \text{Sca1}^+ \text{CD150}^+ \text{CD48}^- \text{CD34}^- \text{Flt3}^-$  et les CSH à courte durée de vie qui eux sont  $\text{lin}^- \text{ckit}^+ \text{Sca1}^+ \text{CD150}^+ \text{CD48}^- \text{CD34}^+ \text{Flt3}^-$ . Ces cellules vont donner les progéniteurs multipotents (MPP, Multipotent Progenitors) qui ne sont plus capables de s'auto-renouveler mais gardent la capacité de se différencier dans plusieurs lignages différents. Au cours de leur migration de la moelle osseuse vers le thymus, ces progéniteurs vont restreindre graduellement leur possibilité de différenciation pour donner les « thymus settling progenitors » (TSP) qui vont à leur tour donner les « early thymic progenitors » (ETP,  $\text{Lin}^{\text{lo}} \text{CD44}^+ \text{CD25}^- \text{ckit}^{\text{hi}}$ ) qui sont les thymocytes les plus immatures.

Plusieurs sous-populations de progéniteurs ont été décrites comme étant capables de se différencier en TSP. Les LMPP (lymphoid-primed multipotent progenitors) qui sont caractérisés par une forte expression de fms-like tyrosine kinase 3 (Flt3) sont multipotents pour les lymphocytes T et B et les granulocytes/monocytes (1). Ces cellules expriment des gènes associés au lignage lymphoïde, notamment *Rag2* et *Dntt* (deoxynucleotidyltrans-ferase terminal) qui sont normalement exprimés avant le choix de lignage T et B (2). Les common lymphoid progenitors (CLP,  $\text{Lin}^- \text{IL7R}\alpha^+ \text{ckit}^{\text{lo}} \text{sca}^{\text{lo}}$ ) exprimant le facteur de transcription Ikaros, sont eux aussi capables de se différencier en TSP (3, 4).

Récemment, les travaux de Ramond *et al.* ont démontré que lors de l'embryogenèse le thymus murin est en fait colonisé par plusieurs vagues successives de cellules progénitrices composées de cellules hématopoïétiques hétérogènes en terme de fonction et de stade de différenciation. En utilisant une nouvelle stratégie de phénotypage des ETP, cette équipe a démontré que la première vague de colonisation est composée de cellules ayant un phénotype proche des CLP alors que la seconde vague est quant à elle composée de LMPP (5).



**FIGURE 1:** Stade de différenciation des précurseurs hématopoïétiques issus de la moelle osseuse en lymphocytes T

Au niveau de la moelle osseuse, les cellules souches hématopoïétiques se différencient en cellules multipotentes (MPP). Ces cellules vont initier l'expression de RAG1 et RAG2 pour donner les progéniteurs des TSP (thymic settling progenitors) qui vont gagner le sang et migrer au niveau du thymus. Lors de la colonisation du thymus, la première vague (1<sup>ère</sup>) de progéniteurs est constituée des CLP (common lymphoid progenitors) et la deuxième (2<sup>nd</sup>) de LMPP (Lymphoid primed progenitors). L'expression des récepteurs aux chimiokines CCR7 et CCR9 ainsi que la molécule d'adhésion PGL1 sont essentielles à la migration de progéniteurs au niveau du thymus. Les TSP vont entrer au niveau de la jonction cortico-médullaire dans le thymus et donner les ETP (early thymic progenitors ou thymocytes double-négatifs (DN1)). Ces thymocytes vont ensuite passer par plusieurs stades de différenciation de DN1 à DN4 pour ensuite donner les thymocytes double-positifs (DP). En fonction de leur choix de lignage, les thymocytes vont ensuite se différencier en lymphocytes T simple-positif (SP)

## 2. Road to the thymus

La domiciliation des progéniteurs au niveau du thymus semble mimer la migration des leucocytes au niveau des nœuds lymphatiques ou des tissus, impliquant ainsi différents récepteurs de chimiokines et des molécules d'adhésion. Chez les souris déficientes pour CCR9 et CCR7, les progéniteurs ne sont pas capables de contribuer à la thymopoïèse soulignant l'importance de ces deux récepteurs dans le homing thymique des TSP (6). Les ligands de ces deux récepteurs, CCL19 et CCL21 pour CCR7 et CCL25 pour CCR9 sont notamment produits par l'endothélium thymique (7). Parmi les molécules d'adhésion impliquées dans le « homing » des progéniteurs, on retrouve la PGL1 (P-selectine glycoprotein Ligand 1) dont le ligand, la P-sélectine, est également exprimé par l'endothélium thymique (8). D'autres molécules comme CXCR4 (9), CCR5 (10) et ephrin type B receptor 2 (ETB2) (11) semblent être également impliquées dans l'entrée des progéniteurs dans le thymus. Chez la souris adulte, les TSP accèdent au thymus au niveau de la jonction cortico-médullaire. Ce faible nombre de cellules (estimé à environ 10 cellules,(12)) va ensuite proliférer pour donner les ETP ou thymocytes DN1 ( $CD4^-CD8^-CD44^+CD25^-$ ). Ces cellules vont ensuite migrer vers la zone sub-capsulaire (13).

## 3. Choix du lignage T

Le choix du lignage T n'est pas un événement singulier mais plutôt un enchainement de contraintes développementales hautement régulé. Ainsi, les thymocytes immatures vont percevoir plusieurs signaux lors de leur différenciation de DN1 à DN4.

Au stade DN1 ( $CD4^-CD8^-CD44^+CD25^-$ ), la signalisation via Notch1 (au niveau des thymocytes) et son ligand DLL4 exprimé par les cellules épithéliales thymiques (TEC) vont constituer le premier checkpoint vers le lignage T (14, 15). La signalisation via Notch1 inhibe ainsi la différenciation des DN1 en cellules myéloïdes, lymphocyte B et en cellules dendritiques plasmacytoïdes (16-18). A cette étape, c'est le facteur de transcription GATA3 qui va inhiber la différenciation des DN1 en lymphocytes B (19). GATA3, qui est induit suite à la ligation de Notch avec son ligand, va activement réprimer le facteur critique au développement des lymphocytes B, EBF1 (early B cell factor 1) (20). Les DN1 migrent ensuite plus profondément dans le cortex vers la zone sub-capsulaire. A ce niveau, l'interaction de c-kit au niveau des DN1 avec son ligand (Kit ligand) produit par les cellules stromales va induire la prolifération de ces thymocytes (21). Sous l'action de Notch, les DN1 se différencient en DN2 ( $CD4^-CD8^-CD44^+CD25^+$ ) (22).

Le stade DN2 est marqué par des restrictions supplémentaires en terme de choix de lignages alternatifs (DC et NK) ainsi que par le début des phénomènes de réarrangements au niveau des locus du *TCR $\beta$* , *TCR $\gamma$*  et *TCR $\delta$*  (23, 24). A ce stade, la signalisation induite suite à



la fixation de IL-7 sur son récepteur IL-7R est nécessaire pour le recrutement des histones acétylases au niveau du locus du *Tcrg* (25). Ainsi les DN2 peuvent être divisés en deux sous-populations, IL-7R $\alpha^{\text{hi}}$  et IL-7R $\alpha^{\text{lo}}$  qui vont s'orienter vers les lignages T- $\gamma\delta$  et T- $\alpha\beta$  respectivement (26).

La transition des thymocytes DN2 à DN3, qui se fait au niveau de la zone sub-capsulaire, est marquée par une augmentation de l'expression des gènes *Ptrca* (qui code pour la chaîne pT $\alpha$ ) et *Rag1* (27) impliqués dans la sélection- $\beta$  (voir plus loin). Les thymocytes DN3 (CD4 $^-$ CD8 $^-$ CD44 $^-$ CD25 $^+$ ) terminent leur processus de réarrangement au niveau des loci  $\beta, \gamma, \delta$  (28). Les thymocytes orientés dans la voie des LT $\alpha\beta$  doivent d'abord passer la sélection- $\beta$ , étape essentielle pour accéder au prochain stade de développement (29). Les thymocytes ayant passé cette étape de sélection accèdent ensuite au stade DN4 (CD4 $^-$ CD8 $^-$ CD44 $^-$ CD25 $^-$ ). A ce niveau, toute différenciation en d'autres lignages n'est plus possible. Suite à la stimulation via leur pré-TCR, les cellules vont exprimer les deux corécepteurs CD4 et CD8, se différencier en thymocytes DP (CD4 $^+$ CD8 $^+$ ) et initier leur migration de la zone sub-capsulaire vers la médulla. De l'entrée des précurseurs dans le thymus à leur arrivée au stade DP, 19 jours en moyenne se sont écoulés (30). Au stade DP, les gènes RAG sont ré-exprimés afin de permettre la recombinaison du locus *Tcra* aboutissant ainsi à l'expression d'un TCR $\alpha\beta$  à la surface de ces thymocytes.

#### 4. La sélection- $\beta$

Afin de générer un répertoire très divers de récepteurs à l'antigène, les thymocytes subissent un enchaînement complexe de réarrangement de l'ADN au niveau des gènes *Tcrb* et *Tcra*. Ces phénomènes de recombinaison sont sous le contrôle des recombinases RAG-1 et RAG-2 (31). L'ensemble de ces processus conduit à la recombinaison aléatoire des différents segments V (D) et J (variability-diversity-junction) de ces gènes. Les segments V (D) et J codent pour le domaine variable du TCR impliqué dans la reconnaissance de son ligand ; le complexe qui consiste d'un peptide antigénique présenté par une molécule du CMH de classe I ou II. Ainsi, le réarrangement correct de ces gènes est essentiel à la génération de LT fonctionnels. Lors de la thymopoïèse, un check-point connu comme « la sélection- $\beta$  » permet de contrôler si le réarrangement du locus *Tcrb* est fonctionnel, i.e. s'il respecte le cadre de lecture du segment J.

La sélection- $\beta$  dépend de l'expression du pré-TCR composé de la chaîne TCR $\beta$  (dont le gène doit donc être correctement réarrangé) ainsi que de pT $\alpha$ , les molécules de signalisation CD3 $\gamma$ , CD3 $\delta$  et CD3 $\epsilon$  et la chaîne  $\zeta$ . La voie de signalisation du pré-TCR fait intervenir les kinases de la famille SRC notamment LCK, ZAP70 et LAP ainsi que la protéine adaptatrice SLP76. Ceci va conduire à l'activation des facteurs de transcription NFAT, ETS1, ID3 et NF-

$\kappa$ B qui sont impliqués dans la prolifération et la survie des thymocytes, l'expression des corécepteurs CD4 et CD8, les réarrangements du locus *Tcra* et l'exclusion allélique du *Tcrb* (32). Deux autres signaux, notamment la signalisation via Notch1 (33) ainsi que la liaison de CXCL12 à son récepteur CXCR4 (34), sont également requis lors de la sélection- $\beta$ . Seuls les thymocytes ayant perçu tout ces signaux pourront continuer leur différenciation et prolifèrent (29).

La signalisation du pré-TCR met fin à la transcription de pTa (35, 36). De plus, l'efficacité d'appariement du TCR $\alpha$  avec le TCR $\beta$  est supérieure à celle de pTa (37) facilitant ainsi l'élimination rapide du pré-TCR à la surface un fois que le TCR $\alpha\beta$  est exprimé.

## 5. La sélection positive

A son pic de productivité, le thymus de la souris génère environ 50 millions de cellules DP par jour (38). Les DP sont les premiers thymocytes exprimant un TCR $\alpha\beta$  à leur surface mais la majorité d'entre eux ne sont pas capables de reconnaître les complexes majeurs d'histocompatibilité (CMH) du soi et sont donc inutiles pour l'organisme. Afin d'éliminer les cellules dont le TCR est incapable d'interagir avec le CMH du soi, les DP sont soumis à une pression de sélection stricte. Ce processus connu comme la sélection positive, fournit aux DP présentant un TCR potentiellement utiles à l'organisme un signal de survie leur permettant de continuer leur différenciation en LT CD4 ou CD8 matures fonctionnels.

Au stade DP, les thymocytes expriment faiblement l'IL-7R et fortement SOCS1 (suppressor of cytokine signalling 1), un inhibiteur intracellulaire de la transduction de signaux dépendants de cytokines (39, 40). Ceci rend les DP insensibles aux signaux de survie fournis par l'IL-7 et d'autres cytokines au niveau du thymus. Ainsi, les DP dépendent uniquement d'un signal de survie provenant du TCR suite à son interaction avec le CMH du soi exprimé par l'épithélium thymique, pour éviter cette mort dite par négligence. Pour maximiser la production des LT matures, les DP peuvent réarranger plusieurs fois les gènes *Tcra* afin d'optimiser la probabilité qu'un complexe TCR $\alpha\beta$  capable d'interagir avec le CMH du soi soit exprimé (41). En dépit de cette tentative de sauvetage, 75-80% des thymocytes DP meurent par négligence suggérant que la majorité des TCR générés ne sont pas capables d'interagir suffisamment avec le CMH I ou II (42, 43).

La survie et le choix de lignage CD8/CD4 de thymocytes DP dépendent de leur interaction avec les complexes CMH-peptide du soi présentés par les cellules épithéliales corticales (cTEC). L'expression des molécules de CMH (I et II) uniquement par les cTEC suffit à la génération de LT CD8<sup>+</sup> et CD4<sup>+</sup> (44-46).

## 6. Rôle des cTEC dans la sélection positive

La présentation d'antigène par les cTECs est essentielle à la sélection positive des thymocytes au stade DP. Pour ce faire, les cTECs disposent de différents processus cellulaires spécifiques de dégradation et d'apprêtement d'antigènes. Ainsi, ces mécanismes confèrent aux cTEC un répertoire de complexe CMH-peptide (le ligandome CMH-peptide) distincte de celui des autres cellules présentatrices d'antigènes thymiques ou périphériques.

Les cTEC expriment une sous-unité catalytique du protéasome spécifique, la  $\beta 5t$ . Le protéasome incorporant cette sous-unité est connu comme le thymoprotéasome. Ce-dernier va dégrader des substrats différents de ceux dégradés par le protéasome ayant incorporé les sous-unités  $\beta 5$  (protéasome de ménage) ou  $\beta 5i$  (immunoprotéasome) (47). Les souris déficientes pour  $\beta 5t$  (codé par *Psmbl1*) présentent un défaut dans la sélection positive des LT CD8<sup>+</sup> (48). Ceci est très certainement dû à une altération dans la composition des ligands du CMH de classe I. En effet Nitta *et al.* ont démontré que la sélection positive de différents TCR transgéniques restreint au CMH de classe I est défectueuse chez les souris *Psmbl1* KO (49).

En ce qui concerne la sélection des LT CD4<sup>+</sup>, les cTECs expriment spécifiquement deux protéases lysosomales, la cathepsine L et TSSP (Thymic-specific-serine-protease) qui interviennent dans l'apprêtement des peptides par le CMH II. Les souris déficientes pour la cathepsine L présentent une forte réduction dans le répertoire polyclonal des LT CD4<sup>+</sup> (50). Une déficience en TSSP conduit quant à elle, à des défauts de sélection de certains TCR-transgéniques restreints au CMH II ainsi qu'à une altération des réponses antigène-spécifique des LT CD4<sup>+</sup> (51). De plus, les cTEC ont un niveau de macroautophagie élevé leur permettant d'acheminer des peptides endogènes vers la voie d'apprêtement par le CMH II (52). Des défauts autophagiques au niveau des cTEC altèrent la sélection positive des LT CD4<sup>+</sup> dans des modèles TCR-transgéniques (53).

L'ensemble de ces mécanismes d'apprêtement d'antigènes spécifiques aux cTEC vont promouvoir la génération d'un répertoire de LT CD4 et CD8 très diverse. Cependant, il est à noter qu'une diversité de peptides-CMH restreinte permet de façon surprenante la sélection d'un large répertoire de cellules T. Ainsi, la nature des complexes peptides-CMH exprimés par les cTEC ainsi que la manière dont ces complexes vont effectivement façonner le répertoire polyclonal des LT $\alpha\beta$  restent à ce jour, inconnues.

## 7. Le choix de lignage CD4/CD8

Les thymocytes DP ayant été sélectionnés positivement vont ensuite se développer en CD4SP (CD4<sup>+</sup>CD8<sup>-</sup>) ou CD8SP (CD8<sup>+</sup>CD4<sup>-</sup>). Ce choix de lignage se fera selon la spécificité de leur TCR pour le CMH. Ainsi, les DP ayant reçu des signaux via un TCR restreint au

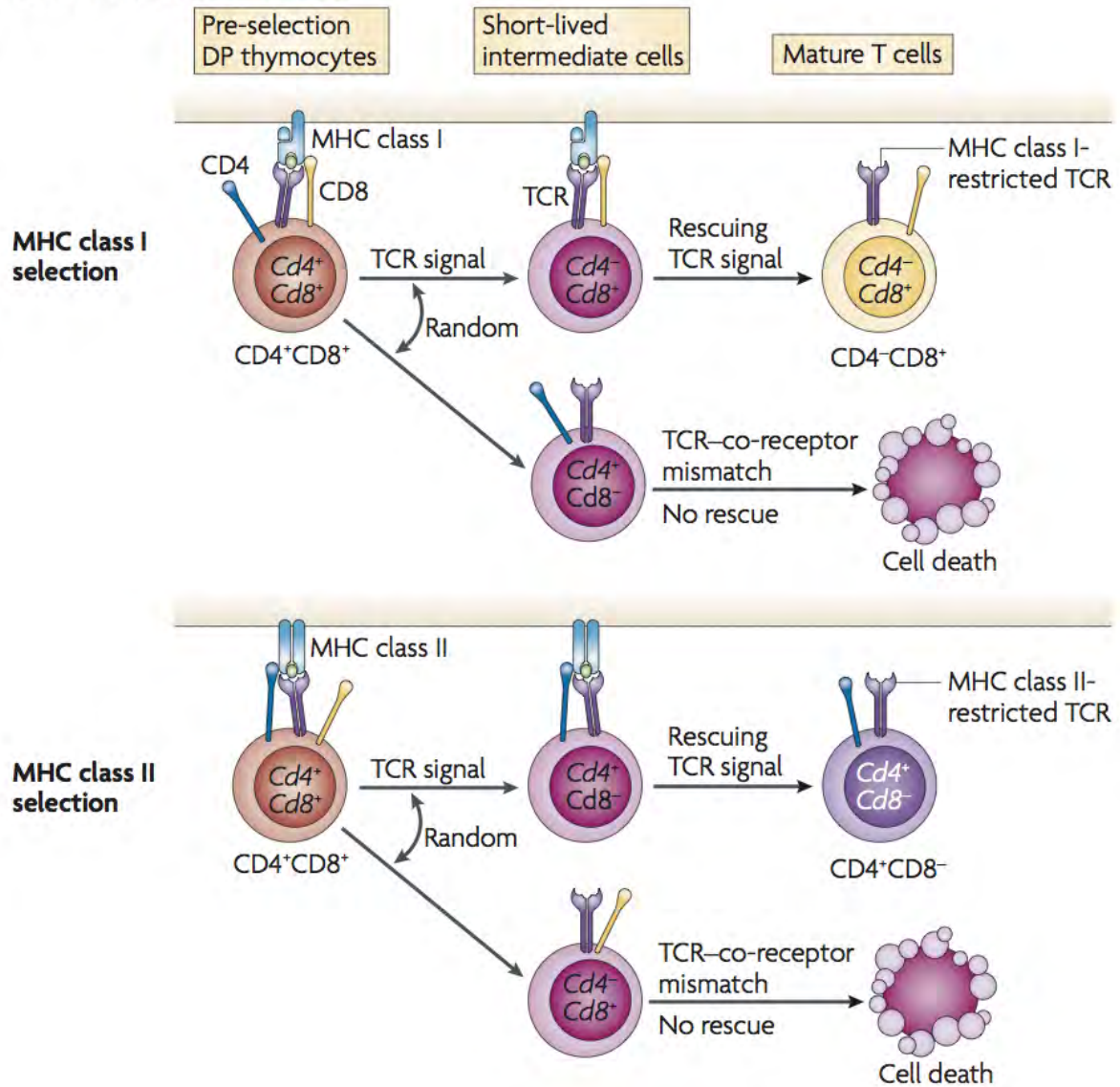
CMH I se différencient en LT CD8<sup>+</sup> alors qu'un signal via un TCR restreint au CMH II induira la différenciation en CD4<sup>+</sup> (54).

Le mécanisme par lequel la restriction du TCR pour un CMH donné contrôle le choix du lignage CD4/CD8 reste à ce jour sujet de débat. Ainsi, au cours de vingt dernières années, plusieurs modèles ont été proposés pour apporter une meilleure compréhension des mécanismes moléculaires et cellulaires impliqués dans le choix de lignage CD4/CD8.

#### a. Le modèle stochastique.

Le modèle stochastique suggère que lors de la sélection positive au stade DP, l'arrêt de l'expression d'un des co-récepteurs se fait de façon aléatoire et qu'une autre étape de « rescue » dépendant du TCR est nécessaire après la sélection positive afin que seuls les thymocytes SP possédant un TCR et un co-récepteur complémentaire puissent survivre et se différencier en LT mature CD4<sup>+</sup> ou CD8<sup>+</sup>. Plusieurs études étaient en faveur de ce modèle. Par exemple, Leung *et al.* ont démontré que l'inhibition de l'élément de contrôle responsable du « silencing » de la transcription du gène CD4 aboutit à une expression persistante du CD4 par tous les thymocytes. Chez ces souris, une forte proportion des LT CD8<sup>+</sup> matures exprime un TCR incompatible, c-à-d restreint au CMH II (55).

Cependant, l'expression constitutive du CD8 lui ne permet pas la sélection de LT CD4<sup>+</sup> dont le TCR est restreint au CMH-I (56). De plus, l'étape de « rescue » de ce modèle implique que les thymocytes SP qui viennent de passer la sélection positive ont une demi-vie très courte et qu'ils meurent rapidement si leur TCR et leur co-récepteur ne peuvent pas agir avec le même CMH. Cet élément clé du modèle stochastique a été remis en question par les travaux de Sarafova *et al.* En effet, ils ont démontré que les thymocytes SP présentant une incompatibilité du TCR et son co-récepteur ont une demi-vie suffisamment longue leur permettant de se différencier en LT matures et de gagner la périphérie (57).



**FIGURE 2: Le modèle stochastique du choix de lignage CD4/CD8**

Ce modèle postule que les thymocytes ayant passé la sélection positive vont de façon aléatoire arrêter l'expression du co-récepteur CD4 ou celle du CD8. Ceci conduit à la génération de cellules intermédiaires ayant une courte durée de vie qui vont mourir par apoptose si elles ne reçoivent pas un signal de leur TCR. Comme ce signal de survie nécessite une association correcte du TCR avec le bon co-récepteur, 50% des thymocytes ayant passé la sélection ne vont pas survivre.

DP: double-positive; MHC: major histocompatibility complex; TCR: T cell receptor

D'après Singer et al. (58)

## b. Le modèle instructif basé sur la force du signal

Les modèles instructifs partent du postulat que lors de la sélection positive, c'est la signalisation du TCR qui va mettre fin à l'expression du co-récepteur incompatible. Ces modèles proposent donc que la signalisation issue d'un TCR restreint par le CMH I est différente de celle issue d'un TCR restreint par le CMH II.

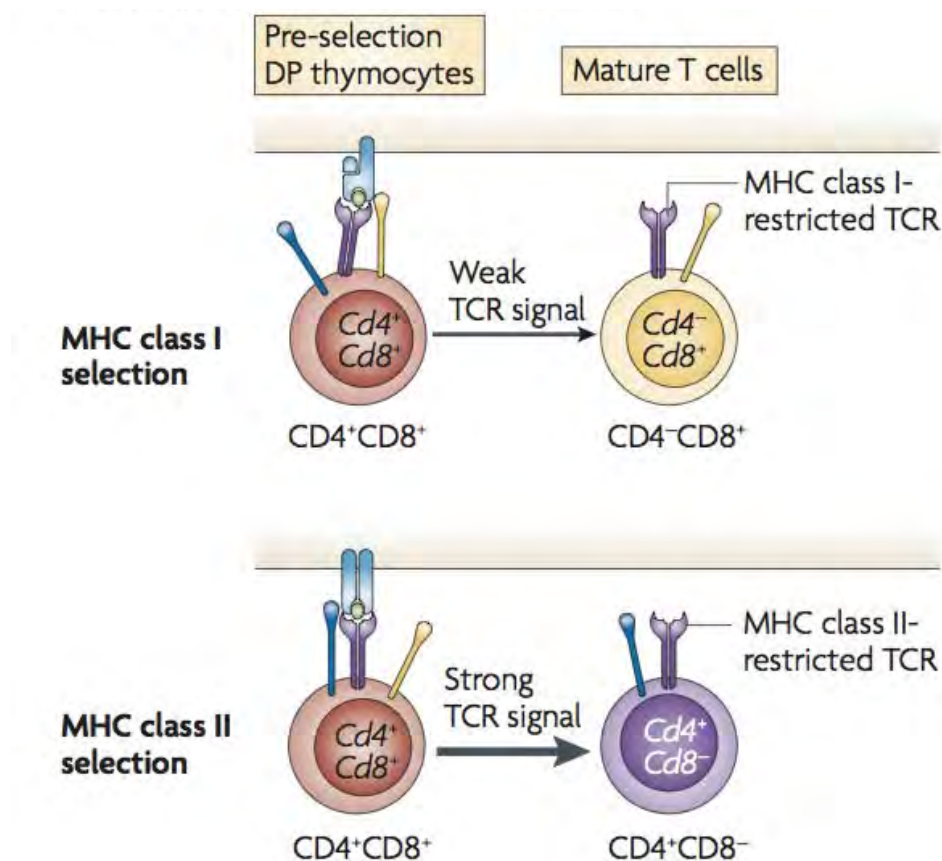
Le premier modèle instructif proposait que les co-récepteurs CD4 et CD8 traduisent des signaux instructifs qualitativement distincts (59). Ce modèle a ensuite été remplacé par celui qui postule que c'est la différence dans la force du signal issu du co-engagement TCR et co-récepteur, lors de la sélection positive, qui définit le choix de lignage CD4/CD8 (60).

Les domaines intracellulaires des co-récepteurs CD4 et CD8 sont associés à la protéine tyrosine kinase LCK, qui va initier la transduction du signal issu du TCR après son activation enzymatique. Vu que le domaine cytosolique du CD4 va interagir avec un nombre plus important de molécules de LCK que celui du CD8, le co-engagement TCR-CD4 avec le CMH II génère un signal fort alors que celui du TCR-CD8 avec le CMH I génère un signal faible (61, 62). Ce serait donc la force relative de ces signaux qui va interrompre de façon spécifique l'expression du CD4 ou du CD8. Les travaux de Itano et al. sont venus conforter cette hypothèse. En effet, ils ont générés des souris transgéniques exprimant un co-récepteur chimère où la molécule CD8 $\alpha$  contient le domaine cytosolique du CD4. Chez ces souris, on retrouve en périphérie des LT CD4<sup>+</sup> restreint au CMH I suggérant que lors de la sélection positive, les DP restreints au CMH I ont été instruits à se développer en LT CD4<sup>+</sup>. Par contre, lorsque ces thymocytes expriment un TCR transgénique présentant une faible affinité pour le CMH I, ces cellules ne se différencient pas en LT CD4<sup>+</sup>. Il a été donc proposé que le choix du lignage CD4/CD8 est régi par la force globale des signaux transduits lors du co-engagement du TCR et du co-récepteur. Ainsi un signal fort conduit au lignage CD4 et un signal faible au lignage CD8 (60).

Plusieurs études sont venues remettre en question cette conclusion. Afin d'évaluer l'effet de l'intensité de signalisation du TCR sur le choix de lignage, Love *et al.* ont généré des souris mutantes exprimant des nombres différents de molécules ITAM (Immunoreceptor tyrosine-based activation motifs) associées au TCR. La réduction dans le nombre d'ITAM aboutit à une diminution de l'intensité du signal TCR et du nombre de thymocytes SP. Par contre, le choix du lignage CD4/CD8 n'est pas altéré (63). La contribution de l'engagement du co-récepteur à l'intensité du signal TCR a également été réévaluée. L'équipe de Singer a généré par knock-in des souris où le co-récepteur chimère CD8-domaine cytosolique du CD4 (souris CD8.4) induit une signalisation plus forte que celui généré précédemment. L'allèle CD8.4 étant régulé par la machinerie transcriptionnelle du *CD8 $\alpha$*  endogène, son expression sera synchrone avec celle du CD8 $\alpha$ . Ceci permet de s'affranchir des artefacts potentiels liés à



l'expression aberrante du CD8. Chez ces souris, la sélection positive de LT restreints au CMH I est augmentée mais encore une fois le choix de lignage CD4/CD8 n'est pas altéré car les LT des souris CD8.4 sont exclusivement des LT CD8<sup>+</sup> (64). L'ensemble de ces données contredit les fondements du modèle instructif basé sur la force du signal.



**FIGURE 3: Le modèle instructionnel du choix de lignage CD4/CD8 basée sur la force du signal**

Ce modèle postule qu'un signal TCR faible met fin à l'expression du *Cd4* et à l'inverse un signal TCR fort met fin à la transcription du *Cd8*. Ainsi, la signalisation de faible intensité provenant des TCR restreints au CMH-I et du CD8 va conduire à la différenciation en lymphocytes T CD8<sup>+</sup> matures. La signalisation provenant des TCR restreints au CMH-II et du CD4 étant plus fort, cela induit la différenciation en lymphocytes T CD4<sup>+</sup> matures.

DP: Double-positive; MHC: major histocompatibility complex; TCR: T cell receptor

D'après Singer *et al.* (58)

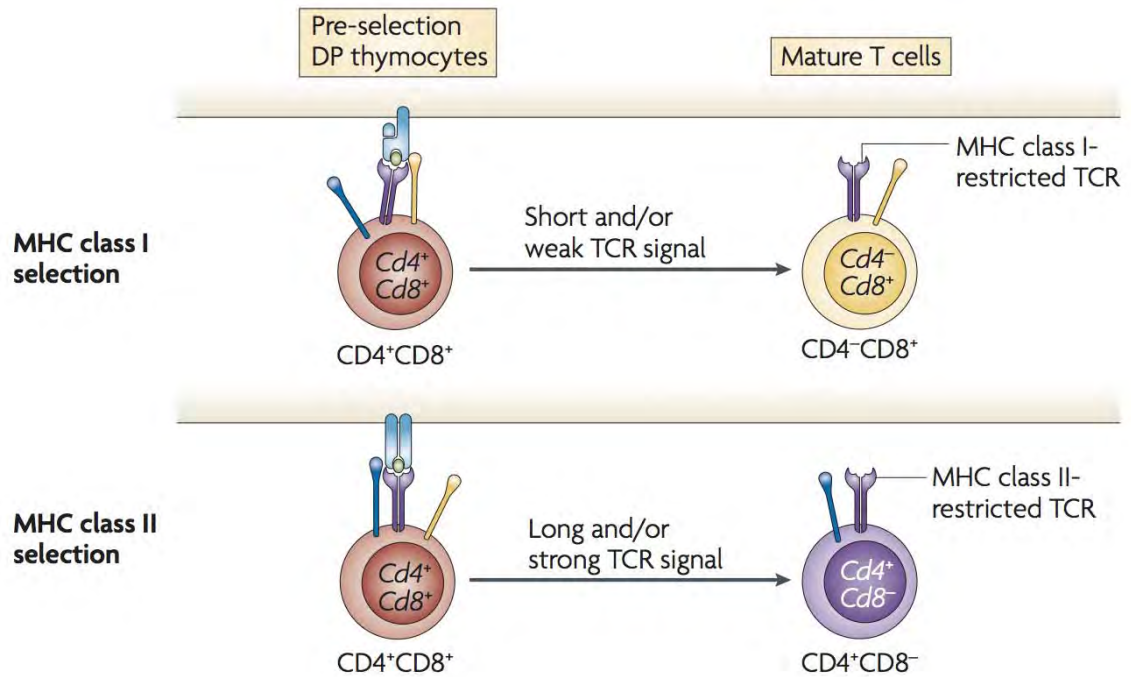


### c. Le modèle instructif basé sur la durée du signal

Ce modèle propose que le choix de lignage CD4/CD8 se fait en fonction de l'effet combiné de la force du signal et de sa durée. Ainsi, un signal TCR de longue durée va instruire les thymocytes DP à arrêter l'expression du CD8 et se différencier en LT CD4<sup>+</sup> SP alors qu'un signal de courte durée instruira ces-derniers à arrêter l'expression du CD4 et se développer en LT CD8<sup>+</sup> SP.

Ce modèle implique que la signalisation *via* des TCR restreints au CMH I et celle *via* des TCR restreints au CMH II auraient des durées différentes. En effet, il a été démontré que lors de la sélection positive, tous les thymocytes DP diminuent l'expression du CD8 à leur surface, altérant ainsi la signalisation des TCR restreints au CMH I mais moins celle des TCR restreints au CMH II expliquant ainsi les différences dans la durée du signal. Les thymocytes CD4<sup>+</sup>CD8<sup>low</sup> seraient donc les précurseurs de LT CD4SP ou CD8SP (65). Les mécanismes impliqués dans la diminution sélective du CD8 au niveau des thymocytes DP sont à ce jour peu connus.

Ce modèle suppose que la sélection positive induite par la signalisation issue du TCR au stade DP va modifier l'expression membranaire du CD4 et du CD8 permettant l'acquisition du phénotype CD4<sup>+</sup>CD8<sup>low</sup> (thymocytes intermédiaires) et cela malgré une transcription continue des gènes *Cd4* et *Cd8*. Cependant, Bosselut *et al.* ont démontré que la perte de l'expression asymétrique des co-récepteurs au stade DP est due à une diminution de l'expression du CD8 et non pas à une internalisation des molécules de CD8 en surface (66) ce qui contredit ce modèle de choix de lignage basé sur la durée du signal.



**FIGURE 4: Le modèle instructionnel du choix de lignage CD4/CD8 basée sur la durée du signal**

Ce modèle postule qu'un signal TCR court et/ou faible va conduire à l'arrêt de la transcription du *Cd4* alors que les signaux TCR longs et/ou fortes vont eux conduire à l'arrêt de celle du *Cd8*. Selon ce modèle, les signaux des TCR restreints au CMH-I sont différents en terme d'intensité et de durée de ceux des TCR restreints au CMH-II

DP: Double positive; MHC: major histocompatibility complex; TCR: T cell receptor

D'après Singer *et al.* (58)

#### d. Le modèle cinétique (non-classique)

Des études menées *in vitro* et *in vivo* montrent que lors de la sélection positive, les thymocytes DP pouvant transduire un signal *via* le TCR vont arrêter la transcription du CD8 mais pas celle du CD4, indépendamment de leur restriction pour le CMH I ou II. Par contre, ces thymocytes préservent la capacité de se différencier en LT CD4SP ou CD8SP (67). Ainsi, l'arrêt de la transcription génique d'un des co-récepteurs n'est pas irréversible et n'est pas indicatif non plus d'un choix vers le lignage opposé comme suggéré par les modèles classiques.

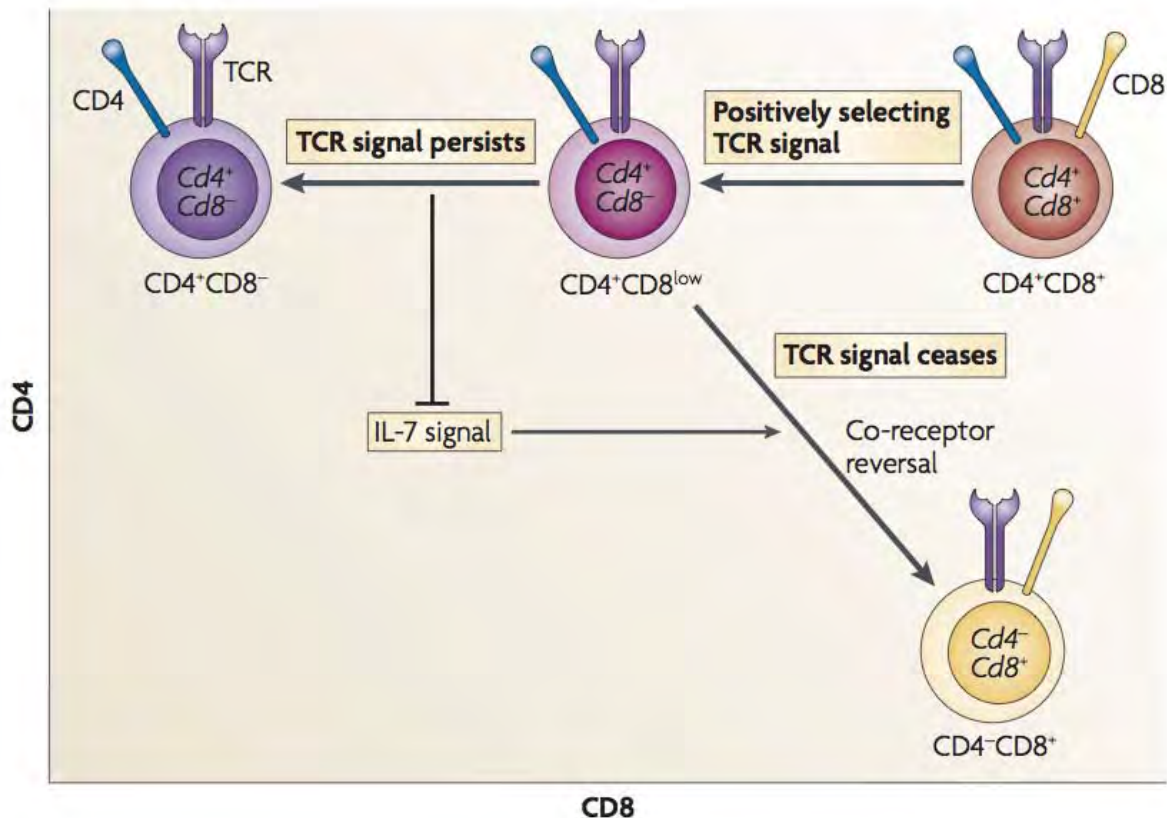
Selon le modèle cinétique, la signalisation du TCR au niveau des thymocytes DP va dans un premier temps conduire à l'arrêt de la transcription du *Cd8*. Ces thymocytes vont ensuite évaluer l'effet de cet arrêt sur le signal TCR. Si ce signal TCR induit lors de la sélection positive persiste en absence de la transcription du *Cd8*, le thymocyte se différencie en LT CD4SP. Par contre, si ce signal cesse en son absence, le thymocyte se différencie alors

en LT CD8SP. Cette « simple » évaluation va permettre au thymocytes DP de savoir dans quel lignage s'engager vu que la signalisation des TCR restreints au CMH II ne dépend pas du CD8 et persistera en son absence alors que celle des TCR restreints au CMH I va elle s'arrêter en absence du CD8. Ce modèle implique que la sélection positive et le choix de lignage ne se fait pas de façon simultanée mais de façon séquentielle.

La différenciation des thymocytes intermédiaires en LT CD8SP nécessite l'arrêt de la transcription du *CD4* et la reprise de celle du *CD8*. Cette réversion du co-récepteur est le pilier du modèle cinétique. Vu que ce phénomène concerne des thymocytes qui ne reçoivent plus des signaux via le TCR, les cytokines telles que l'IL-7 et possiblement d'autres cytokines- $\gamma_c$  sont essentielles à la survie de ces cellules et potentiellement à l'induction de l'expression du CD8. En effet, Yu *et al.* ont démontré que l'IL-7 et d'autres cytokines- $\gamma_c$  peuvent non seulement induire la survie de thymocytes intermédiaires mais également la réversion du co-récepteur en augmentant le silencing de la transcription du *Cd4* et la reprise de celle du *Cd8* (68).

Plusieurs études sont venues renforcer l'hypothèse que le choix du lignage CD8 dépend de l'IL-7 alors que celle celui du CD4 est indépendante de cette cytokine. Brugnera *et al.* ont démontré qu'en bloquant la fixation de l'IL-7 sur son récepteur l'IL-7R, on abolit la génération des LT CD8SP (67). De plus la délétion de SOCS, inhibiteur de la signalisation issue de l'IL-7R, conduit exclusivement à la génération de LT CD8SP (69).

Le mécanisme proposé par le modèle cinétique est le suivant : un signal TCR persistant va inhiber l'expression de l'IL-7R et rendre la cellule insensible à l'IL-7 conduisant à la différenciation des thymocytes intermédiaire en LT CD4SP. Par contre, si ce signal est interrompu, la signalisation issue de l'IL-7R va induire la réversion du co-récepteur et la différenciation en LT CD8SP.



**FIGURE 5: Le modèle cinétique du choix de lignage CD4/CD8**

Indépendamment de la restriction de leur TCR pour un CMH donné, les thymocytes DP ( $CD4^+CD8^+$ ) sélectionnés positivement vont diminuer l'expression du CD8 pour passer à un stade intermédiaire ( $CD4^+CD8^{low}$ ). Le choix de lignage se fait à ce stade. Une signalisation TCR à ce stade inhibe la signalisation dépendante de l'IL-7 et conduit à la différenciation en lymphocytes T  $CD4^+$  matures. L'arrêt de la signalisation du TCR va rendre les cellules sensibles à l'IL-7, induire la réversion du co-récepteur et conduire à la différenciation en lymphocytes T  $CD8^+$

D'après Singer *et al.* (58)

#### e. Rôle des enhancer E8 dans le choix du lignage

La régulation de l'expression des gènes CD4 et CD8 diffère sur le plan transcriptionnelle. L'expression du CD4 dépend de l'activité d'un « silencer » sur son gène qui va inhiber sa transcription au niveau des cellules  $CD4^-$  (70, 71). A l'inverse, celle du CD8 dépend de l'activité de plusieurs éléments enhancer présents au sein de son gène qui vont induire sa transcription à différents stades du développement des thymocytes (72, 73). Cinq enhancers ( $E8_I$ - $E8_V$ ) ont été identifiés au niveau du gène *Cd8a* (72-75).

Plusieurs études suggèrent que les enhancers  $E8_I$  et  $E8_{III}$  seraient impliqués dans le choix de lignage CD4/CD8.  $E8_{III}$  est actif qu'au niveau des thymocytes DP (76) et  $E8_I$  est lui actif qu'au niveau des thymocytes CD8SP et des LT  $CD8^+$  matures (77). La signalisation TCR au niveau des thymocytes DP inhibe l'activité de  $E8_{III}$  (57) alors que la signalisation

issue de l'IL-7R induit *via* STAT5 l'activation de E8<sub>1</sub> (78). Ces deux phénomènes sont cohérents avec le modèle cinétique avec une inhibition du CD8 par un signal TCR persistant et une réversion du co-récepteur en réponse à l'IL-7.

#### f. Facteurs de transcription impliqués dans le choix de lignage

L'identification de facteurs de transcription impliqués dans la régulation de l'expression du CD4 et du CD8 a grandement contribué à apporter une meilleure compréhension sur le choix du lignage CD4/CD8.

#### *Th-POK*

Le gène *Zbtb7b* (zinc-finger-and-BTB-domain-containing 7b) code pour une protéine à doigts de zinc, Th-POK (T-helper-inducing POZ/Kruppel-like factor) (79). Ce facteur de transcription est exprimé par les LT CD4<sup>+</sup> uniquement (80). Chez les souris déficientes pour Th-POK, les thymocytes restreints au CMH-II se différencient en LT CD8SP (79). A l'inverse, l'expression constante de Th-POK au cours du développement conduit à la différenciation des thymocytes exclusivement en LT CD4SP, même ceux restreint au CMH-I (80). Th-POK est considéré comme la protéine régulatrice maitresse du choix de lignage CD4. En effet, Jenkinson *et al.* ont démontré que la transduction rétrovirale de LT CD8<sup>+</sup> avec Th-POK conduit la perte partielle de la capacité cytotoxique de ces cellules et à l'acquisition de certains caractéristiques des LT CD4<sup>+</sup> (81). Ainsi même les LT CD8<sup>+</sup> matures sont susceptibles à l'effet pro-lignage-CD4 de Th-POK. Ce facteur agit aussi bien sur l'expression du CD4 et du CD8. Th-POK inhibe l'action de RUNX3 impliqué dans le silencing du *Cd4* (82) et en parallèle diminue l'activité de la séquence enhancer E8<sub>1</sub> du *Cd8* (81). La signalisation continue du TCR au niveau des thymocytes intermédiaires induit l'augmentation de l'expression de Th-POK (79), ce qui est cohérent avec le modèle cinétique du choix de lignage.

#### *RUNX1/RUNX3*

Les protéines RUNX font partie de la famille des facteurs de transcription à domaine RUNT (83). RUNX1 est exprimé par les thymocytes DN alors que RUNX3 est lui exprimé par les thymocytes CD8SP post-sélection-positive. Les deux protéines se lient à la séquence silencer du CD4 et vont donc diminuer son expression (82). L'expression de RUNX3 est essentielle à la différenciation des thymocytes intermédiaires en LT CD8SP. RUNX3 va d'un côté diminuer l'expression du CD4 (82) et de l'autre augmenter celle du CD8 via une interaction avec la séquence enhancer E8<sub>1</sub> du *Cd8* (84). RUNX3 agit également sur

l'expression du CD4 en inhibant l'expression de Th-POK (85). Ainsi, RUNX3 serait médiateur transcriptionnel de la réversion du co-récepteur permettant le choix de lignage CD8. A ce jour, les signaux intrathymiques induisant l'expression du RUNX3 lors de la différenciation en LT CD8SP ne sont pas connus, mais selon le modèle cinétique, ce serait l'IL-7 et/ou d'autres cytokines- $\gamma_c$  qui agiraient directement ou indirectement sur son expression.

### TOX

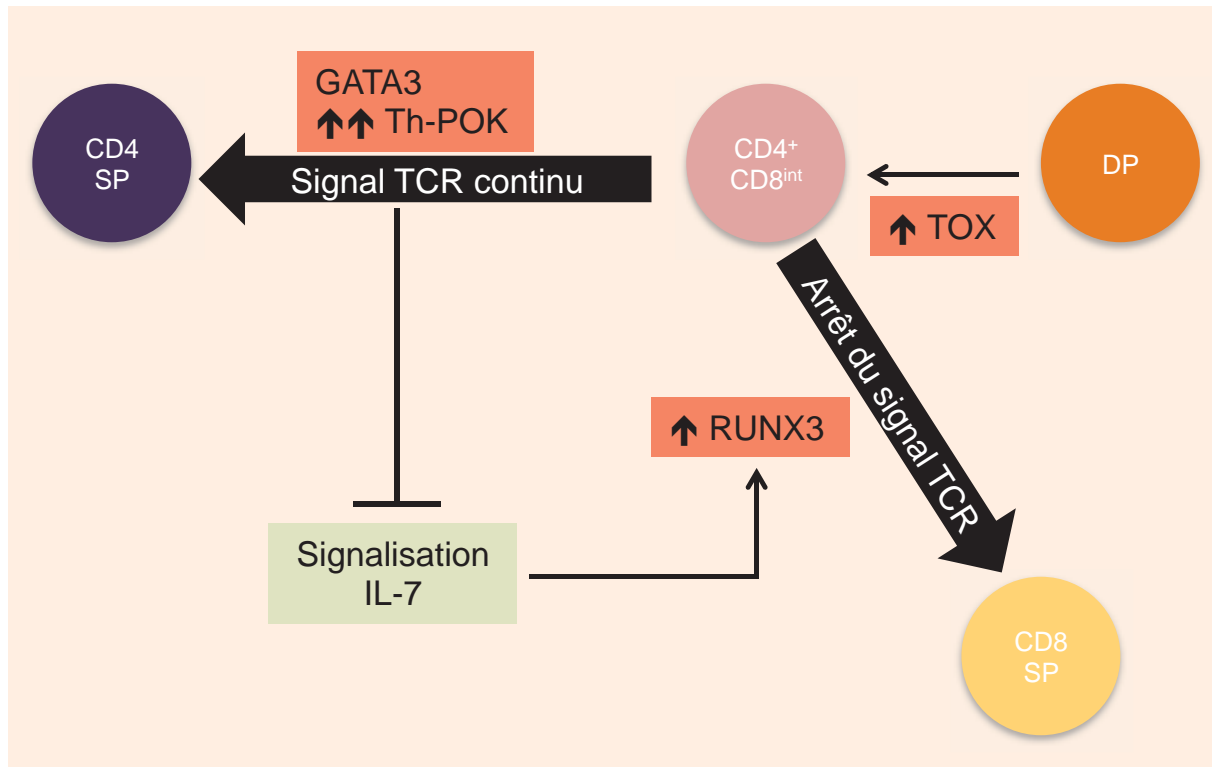
La protéine TOX (thymus high-mobility group box protein) régule l'expression de gènes via son domaine HMG en modulant la structure de la chromatine et en recrutant d'autres facteurs nucléaires (86, 87). Aliahmad *et al.* ont démontré que chez les souris déficientes pour TOX, les thymocytes ayant été positivement sélectionnés n'adoptent plus le phénotype CD4<sup>+</sup>CD8<sup>low</sup> mais deviennent CD4<sup>low</sup>CD8<sup>low</sup> sans pouvoir ensuite se différencier en LT CD4SP alors que des LT CD8<sup>+</sup> eux se développent normalement (88). TOX est par conséquent requis pour augmenter et maintenir l'expression du CD4 chez les thymocytes DP ayant passé la sélection positive.

### GATA3

La protéine GATA3 est exprimée très tôt au cours de la thymopoïèse par les précurseurs des LT (89). Elle est nécessaire dès le stade DN pour guider les thymocytes dans le lignage LT. GATA3 est également impliqué dans le choix de lignage CD4. En effet, l'augmentation de son expression est induite suite à la signalisation TCR au niveau des thymocytes DP (90). De plus, l'expression constitutive de GATA3 par les thymocytes inhibe le développement des LT CD8SP (91) alors qu'une déficience en ce facteur inhibe la génération des LT CD4SP (92). Tout comme Th-POK, GATA3 lui-aussi contrôle la survie et/ou la différenciation des LT CD4SP. Les récents travaux de Wang *et al.* suggèrent que GATA3 agirait en amont de Th-POK. En effet, ils ont démontré que GATA3 peut se fixer sur la région promotrice du gène *Zbtb7b*. De plus, en absence de GATA3, les thymocytes ayant passé la sélection positive exprime moins de Th-POK (93). Ainsi, lors du choix de lignage CD4, GATA3 induirait directement l'expression de Th-POK qui va ensuite permettre à la différenciation des thymocytes en LT CD4SP.

La sélection positive des thymocytes DP va induire la diminution de l'expression de CXCR4 et en parallèle l'augmentation de l'expression de CCR7 et CCR4 (94-96). Ceci va rendre les thymocytes sensibles au gradient des chimiokines CCL19 et CCL22 produites par

les cellules épithéliales médullaires (mTEC). Les LT CD4SP et CD8SP vont ainsi migrer vers la médulla où ils vont être soumis à la sélection négative.



**FIGURE 6: facteurs de transcription et facteurs environnementaux impliqué dans le choix de lignage CD4/CD8**

La sélection positive des thymocytes au stade double-positif (DP) va induire l'expression des facteurs de transcription TOX, GATA3 et Th-POK. TOX est nécessaire pour le passage des DP au stade intermédiaire (CD4<sup>+</sup>CD8<sup>int</sup>). L'expression de GATA3 est nécessaire pour la différenciation des CD4<sup>+</sup>CD8<sup>int</sup> en lymphocytes T CD4<sup>+</sup>. Quant à Th-POK, la signalisation TCR continu va augmenter son expression au niveau des CD4<sup>+</sup>CD8<sup>int</sup> et orienter ces cellules vers le lignage T CD4<sup>+</sup> tout en inhibant le silencing du *Cd4* par RUNX3. En absence de signal TCR continu, les thymocytes deviennent sensibles à l'IL-7 (et probablement à d'autres cytokines- $\gamma_c$ ). Cette sensibilité à l'IL-7 semble nécessaire à l'induction de l'expression de RUNX3, le facteur clé de la différenciation en lymphocyte T CD8<sup>+</sup>. RUNX3 se fixe sur les séquences enhancer du *Cd8* pour initier à nouveau l'expression du CD8. En parallèle, RUNX3 inhibe l'expression du CD4 en agissant directement sur son gène ou sur celui de Th-POK.

TOX: thymus high-mobility group box protein; Th-POK: T-helper-inducing POZ/Kruppel- like factor



## 8. La sélection négative

Le réarrangement des segments V(D)J des gènes du TCR ainsi que l'ajout de nucléotides au niveau des jonctions permet à l'organisme de générer un répertoire de LT très divers afin d'anticiper le plus efficacement les agressions par un nombre important de pathogènes. Ces phénomènes de recombinaison étant aléatoires, l'organisme va générer également des LT spécifiques pour des antigènes du soi qui peuvent induire en périphérie des pathologies auto-immunes. Ainsi, plusieurs mécanismes ont été mis en place afin de neutraliser les LT auto-spécifiques. La tolérance centrale englobe l'ensemble des phénomènes de tolérance au soi qui a lieu dans le thymus et elle se déroule principalement dans le médulla.

Dans les souris où l'expression des molécules de CMH I et II est restreinte qu'au niveau des cTEC, les lymphocytes T qui s'y développent sont enrichis en cellules auto-spécifiques (45, 46). Plus récemment, Kurobe *et al.* ont démontré qu'en absence de CCR7, récepteur impliqué dans la migration cortico-médullaire, les thymocytes SP matures ne migrent pas vers la médulla et gagnent directement la périphérie où ils vont induire des phénomènes auto-immuns (97). Des pathologies similaires sont retrouvées chez des souris présentant une désorganisation de la médulla (98) ou un développement altéré de cellules épithéliales médullaires (99). L'ensemble de ces travaux souligne l'importance de la médulla dans l'induction de la tolérance centrale.

## 9. Les mécanismes de tolérance centrale

A ce jour, deux mécanismes de tolérance centrale ont été décrits au niveau du thymus et ils reposent sur la présentation d'antigènes du soi au LT CD4SP ou CD8SP dans la médulla.

### a. La délétion clonale

L'utilisation de différents modèles de souris transgéniques où les LT possèdent un TCR spécifique pour un (néo-)antigène du soi a permis de mettre en évidence la délétion des LT auto-spécifiques au niveau du thymus. Par exemple, dans le modèle H-Y où les LT CD8<sup>+</sup> sont spécifiques d'un antigène présent uniquement chez les souris mâles, Kisielow *et al.* ont démontré que ces cellules sont présentes chez les souris femelles mais délétées chez les mâles (100). A ce jour plus d'une trentaine de modèles de souris transgéniques ont été utilisés pour étudier la délétion clonale. Suivant le modèle utilisé, les thymocytes étaient délétés précocement ou tardivement au cours de leur développement, ce qui ne permettait pas de conclure sur l'étape de développement à laquelle se produit la sélection négative (101). Ces résultats conflictuels sont très certainement dus au fait que le TCR $\alpha\beta$  transgénique est exprimé très tôt lors de la thymopoïèse. Ainsi, les thymocytes présentant un TCR

transgénique peuvent interagir plus tôt avec un complexe CMH-peptide du soi alors que chez la souris sauvage, cette interaction n'est possible qu'à partir du stade DP.

Afin de se rapprocher de ce qui se passe en conditions physiologiques, l'équipe d'Hogquist a généré une souris où le TCR $\alpha\beta$  H-Y est exprimé qu'à partir du stade DP (102). La délétion des thymocytes chez ces souris n'intervient qu'à un stade tardif du développement, c.-à-d. au stade SP. Ces travaux rejoignent ceux de Kappler *et al.* qui ont démontré la délétion au stade SP des thymocytes spécifiques pour un super-antigène endogène (103).

La délétion clonale va conduire à la mort par apoptose des LT SP dont les TCR présentent une forte affinité pour les complexes CMH-peptide du soi. En ce qui concerne les acteurs impliqués dans l'induction de cette apoptose suite à l'interaction TCR-CMH/peptide, plusieurs études suggèrent un rôle des membres de la famille des MAPK (Mitogen-Activated Protein Kinase) et celle de BCL-2 (B-cell lymphoma 2). McCarty *et al.* ont démontré que MINK (NIK-related misshapen-like Kinase) est impliqué dans la transduction du signal issu du TCR et va conduire à l'activation de la protéine pro-apoptotique BIM<sub>EL</sub> (BCL-2 interacting mediator of cell death, extra-long). Le silencing de MINK diminue la délétion clonale tout comme la délétion du gène BIM (104).

#### b. L'anergie

Les superantigènes sont des protéines qui sont capables d'interagir simultanément avec des molécules de CMH-II en dehors du sillon peptidique et certains domaines V $\beta$  du TCR. Cette liaison particulière permet l'activation des LT présentant ces V $\beta$ . Afin de restreindre l'expression des superantigènes Minor lymphocyte stimulatory (Mls) encodés par les MMTV (mouse mammary tumor virus) endogènes, l'équipe de Ramsdell a généré des chimères hématopoïétiques où uniquement les cellules radorésistantes de l'hôte expriment ces antigènes. Ils ont ensuite analysé la délétion clonale des LT-V $\beta$ 6 dont le TCR est spécifique pour les Mls. De façon inattendue, ils ont observé la présence des LT-V $\beta$ 6 en périphérie. Ces cellules étaient dans un état d'anergie (105). L'anergie correspond à un état d'hypo-réactivité caractérisé par une absence de prolifération et de production de cytokines suite à une stimulation antigénique. La présence de l'antigène ayant induit l'anergie des LT lors de la sélection négative est également nécessaire en périphérie afin de maintenir cet état anergique (106).

## 10. Les cellules médullaires impliquées dans la sélection négative

### a. Les cellules épithéliales médullaires

Les mTEC sont la seule population de CPA à exprimer un panel d'antigènes spécifiques de tissus (TSA) au niveau du thymus. L'expression ectopique de ces TSA par les mTEC sont en partie sous le contrôle du facteur de transcription AIRE (Autoimmune Regulator, voir plus loin, (107)). La présentation d'antigènes par les mTEC peut induire directement la sélection négative de LT CD4<sup>+</sup> et CD8<sup>+</sup> (108, 109). Malgré l'observation que la population de mTEC dans son ensemble exprime presque tout le transcriptome périphérique, l'expression d'un TSA donné est restreinte à seulement 2-3% des mTEC à un instant donné. Le lien entre cette expression mosaïque de TSA et une présentation suffisamment importante de ces antigènes pour permettre une sélection négative efficace reste à être élucidé.

### b. Les cellules dendritiques de la médulla

Les DC représentent environ 0.5% de la population cellulaire totale du thymus. On distingue trois grandes sous-populations de DC thymiques, les DC classiques (cDC) résidents, les cDC migratoires et les DC plasmacytoïdes (110). Certes ces populations n'expriment pas AIRE mais elles sont capables de présenter non seulement des antigènes ubiquitaires mais également des TSA provenant des mTEC. En effet, l'organisation particulière de la médulla permet le transfert d'antigènes du soi des mTEC vers les CPA d'origine hématopoïétiques (111). Pour démontrer l'importance de ce transfert d'antigène dans la tolérance centrale, Taniguchi *et al.* ont utilisé des tétramères de CMH-II afin d'étudier la sélection négative des LT CD4<sup>+</sup> spécifiques de la « Interphotoreceptor retinoid-binding protein » (IRBP). IRBP, étant un TSA, son expression est restreinte au mTEC dans le thymus. Une déficience en CMH-II au niveau des cellules hématopoïétiques abolit la délétion des T CD4<sup>+</sup> spécifiques de IRBP. Ainsi, le transfert intercellulaire de TSA des mTEC vers les APCs hématopoïétiques est impliqué dans la sélection négative (112). De façon intéressante, la délétion des LT CD4<sup>+</sup> par les DC repose entièrement sur ce transfert d'antigènes des mTEC. Ce qui n'est pas le cas pour la sélection négative des LT CD8<sup>+</sup> (108). La relevance relative de chaque population de DC dans l'induction de la tolérance centrale n'est pas connue à ce jour.

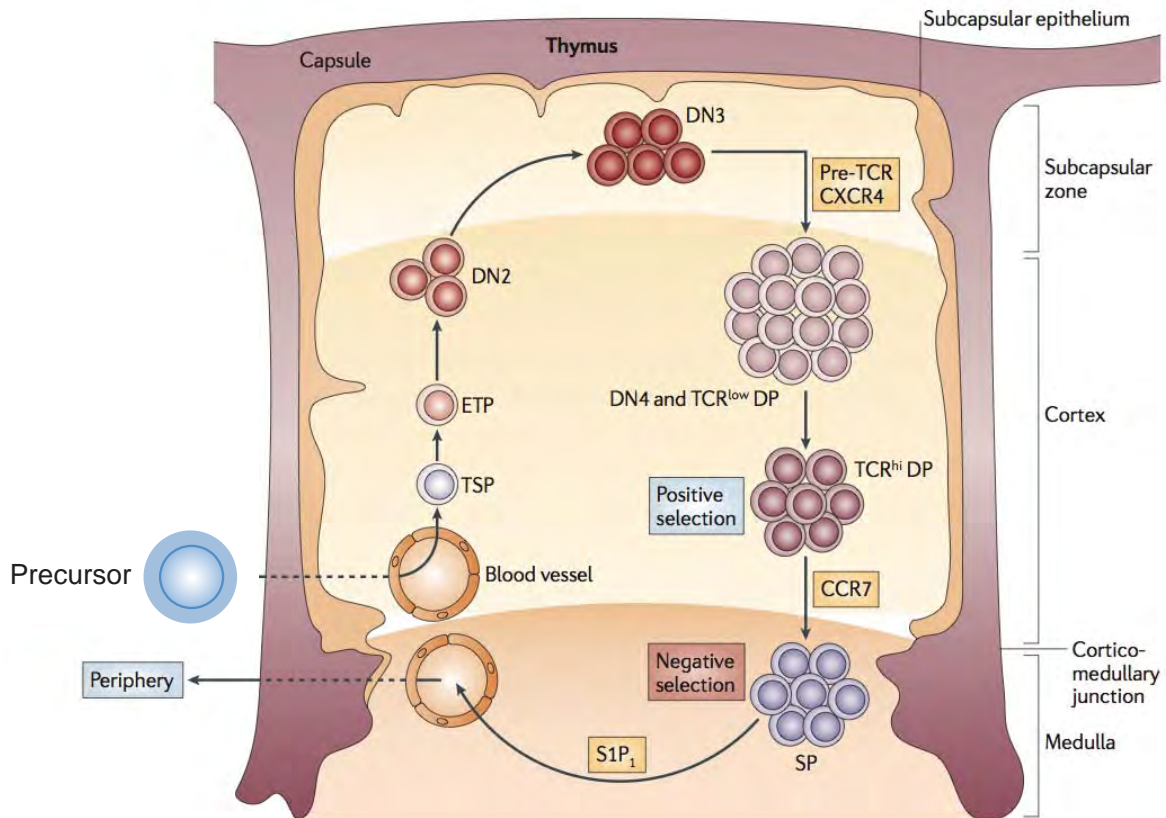
L'utilisation de chimères hématopoïétiques a permis de comprendre la contribution des DC (radiosensibles) et des mTEC (radiatorésistantes) à l'anergie et la délétion clonale. En effet, cette technique permet de restreindre l'expression du CMH uniquement à un compartiment donné à la fois. Ainsi, plusieurs études ont démontré que les cellules radiatorésistantes (mTEC)

induisent l'anergie des LT auto-spécifiques (113-116) et que les cellules radiosensibles (DC) sont responsable de la délétion (117, 118).

## 11. La sortie des LT du thymus

Lors de leur séjour, estimé entre 4-5 jours (119), dans la médulla, les LT SP vont terminer leur différenciation passant d'un phénotype semi-mature activé ( $CD69^{\text{high}}CD62L^{\text{low}}CD24^{\text{high}}$ ) à un phénotype mature quiescent ( $CD69^{\text{low}}CD62L^{\text{high}}CD24^{\text{low}}$ ). Durant cette transition, les LT SP sont encore sensibles aux signaux pro-apoptotiques et peuvent subir la sélection négative. Cependant, une fois à l'état mature, les LT SP sont réfractaires à l'apoptose (120).

Les LT SP matures expriment CCR7, CCR8, CCR9 et CXCR4 mais une déficience en ces récepteurs aux chimiokines ne semble pas influencer leur émigration du thymus (121-123). Par contre, une déficience en  $S1P_1$  (sphingosine-1-phosphate receptor 1) conduit à une accumulation des LT SP matures dans la médulla suite à un défaut de leur sortie hors du thymus (124).  $S1P_1$  est fortement exprimé par les LT SP et son ligand la sphingosine-1-phosphate (S1P) est produit par les péricytes au niveau de la jonction cortico-médullaire (125) et est retrouvé à forte concentration dans la circulation sanguine (126). Ainsi, S1P va permettre la mise en place d'un gradient chémo-attracteur pour la migration des LT SP matures vers les vaisseaux sanguins au niveau de la jonction cortico-médullaire et hors du thymus.



**FIGURE 7 : Migration des thymocytes lors de la thymopoïèse**

A leur entrée dans le thymus au niveau de la jonction cortico-médullaire, les précurseurs hématopoïétiques (TSP, thymic settling progenitors) vont se différencier en ETP (early thymic progenitors) qui vont à leur tour donner les thymocytes double-négatifs DN2 et DN3. Ces-derniers vont migrer vers la zone sub-capsulaire. L'expression du pré-TCR (pre-TCR) et de CXCR4 par les DN3 vont permettre leur prolifération et leur différenciation en DN4 et par la suite en thymocytes double-positifs (DP). Les DP ayant eu une interaction suffisamment forte avec les complexes CMH-peptides présentés par les cellules épithéliales corticales pour être sélectionnés positivement. La sélection positive induit l'expression de CCR7 permettant ainsi aux thymocytes simple-positifs (SP) de migrer au niveau de la médulla où ils vont être soumis à la sélection négative. L'émigration des lymphocytes T CD4<sup>+</sup> et CD8<sup>+</sup> matures du thymus dépend de l'expression du récepteur au sphingosine-1-phosphate (S1P<sub>1</sub>)

D'après Love *et al.* (127)

## II-La tolérance périphérique

Alors que la majorité des LT auto-spécifiques est neutralisée par la tolérance centrale, certaines cellules s'en échappent et se retrouvent en périphérie. Plusieurs raisons peuvent expliquer l'échappement à la sélection négative thymique. Premièrement, tous les antigènes du soi, notamment ceux exprimés lors du développement et lors d'infections chroniques, ne sont pas ou peu exprimés dans le thymus. De plus, les résultats de la littérature suggèrent que la sélection négative thymique va éliminer préférentiellement les précurseurs de LT dont le TCR a une haute affinité pour les complexes CMH-peptide du soi exprimés par les mTEC et DC thymiques (128). Ceci implique que des LT présentant une plus faible affinité pour des antigènes du soi vont échapper la tolérance centrale. Afin de contrôler les LT auto-spécifiques, plusieurs mécanismes de tolérance périphérique sont mis en place par l'organisme. Ces phénomènes concernent également les LT spécifiques pour des antigènes provenant de l'alimentation et de la flore intestinale commensale qui nécessitent eux-aussi une tolérance de la part du système immunitaire.

### 1. La tolérance récessive

La tolérance récessive concerne l'ensemble de mécanismes définis comme passifs car elle ne peut pas être transférée *via* des cellules d'un individu devenu tolérant à l'autre individu immunocompétent.

#### a. L'ignorance des complexes CMH-peptide du soi

L'un des mécanismes limitant la reconnaissance des complexes CMH-peptides du soi par les LT est la barrière physique qui existe entre les LT potentiellement auto-réactifs et les cellules du parenchyme exprimant les TSA. Ceci conduit d'une part à la séquestration des TSA et d'autre part à limiter la migration des LT activés au sein des organes.

Ohashi *et al.* ont utilisé des souris transgéniques où l'expression de la glycoprotéine du LCMV (lymphocytic choriomeningitis virus) est restreinte au niveau des îlots pancréatiques en périphérie. Le croisement de ces souris avec une lignée où les LT CD8<sup>+</sup> expriment un TCR spécifique pour cette glycoprotéine (LT P14) n'induit pas d'auto-immunité au niveau du pancréas. Ainsi les LT P14 ignorent la présence de leur antigène spécifique séquestré au sein du pancréas (129).

D'autres organes vont également limiter l'accès au LT activés. Au niveau de ces organes dits « immuno-privilegiés », l'expression des molécules d'adhérence (P-sélectine, E-sélectine et VCAM) permettant l'entrée de LT activés depuis les vénules post-capillaires est

réduite. Ceci est le cas par exemple au niveau de la barrière hémato-encéphalique limitant l'accès au système nerveux central (130).

### b. L'anergie

L'activation des LT requière trois signaux : l'engagement du TCR avec les complexes CMH-peptide au niveau des CPA, la co-stimulation induite par la liaison du CD28 avec CD80/CD86, et des cytokines telles que l'IL-2. Cependant, l'activation d'un LT en absence du signal deux va induire un état d'hyporéactivité à longue-durée, appelé anergie, qui est caractérisé par une répression active de la signalisation du TCR et de la production cytokinique. Deux récepteurs, CTLA-4 et de PD-1 sont impliqués dans cette induction d'anergie au niveau de LT.

Tout comme le CD28, CTLA-4 se lie aux membres de la famille B7 mais avec une affinité dix fois supérieure à celle de CD28. Cette liaison va induire un signal négatif inhibant la progression du cycle cellulaire. Les LT CD4<sup>+</sup> déficients pour CTLA-4 sont résistants à l'induction de l'anergie (131). En ce qui concerne PD-1, son interaction avec ses ligands PD-L1 et PD-L2 inhibe les fonctions effectrices de LT auto-spécifiques en limitant d'une part la phase initiale d'activation (132) et d'autre part la motilité de ces cellules (133). D'autres gènes notamment *Cbl-b*, *p27kip1*, *Dgkz*, *Egr2/3*, *Itch*, *Nfat1*, *Tob1* et *Grail* sont également exprimés par les cellules anergiques et sont nécessaire pour induire et maintenir cet état d'hyporéactivité (134).

Sur le plan moléculaire, la voie de signalisation de mTOR joue un rôle central dans l'induction de l'anergie. L'inhibition de cette voie par la rapamycine est suffisante pour rendre anergique des LT activés par des anticorps anti-CD3 et anti-CD28. Plusieurs voies énergétiques et nutritionnelle liées à mTOR ont été identifiées comme étant impliquées dans l'anergie (135).

### c. La délétion

En périphérie, les LT auto-réactifs qui sont chroniquement activés par les complexes CMH-peptide du soi vont mourir par apoptose. Les voies apoptotiques médiées par Fas et Bim semblent toutes les deux impliquées dans la délétion.

Fas est un récepteur de mort qui s'active suite à l'interaction avec son ligand correspondant Fas-L. Les souris déficientes pour un de ces deux molécules développent progressivement une lymphadénopathie et une splénomégalie (136). Kawabe *et al.* ont démontré qu'*in vivo*, Fas est nécessaire à la délétion des LT qui ont été chroniquement activés par leurs antigènes du soi ou exogènes (136). L'activation de Fas conduit à la formation du



complexe DISC (Death-inducing signaling complexe), qui va à son tour activer différents caspases et de ce fait induire l'apoptose de la cellule. Cette voie d'activation de l'apoptose est appelée AICD (Activation Induced Cell Death). L'AICD des lymphocytes T nécessite également la présence de l'IL2 (137).

Bim active directement Bax/Bak ce qui induit la perméabilisation de la membrane externe de la mitochondrie déclenchant l'apoptose de la cellule (138). Les souris déficientes pour Bim développent avec l'âge une glomérulonéphrite suite à l'accumulation de complexes immuns (139). Davey *et al.* ont transféré des LT CD8<sup>+</sup> spécifiques de l'ovalbumine (OT-I) dans des souris exprimant cette protéine en périphérie (RIP-OVA). Une déficience en Bim des OT-I les rendait insensibles à la délétion (140).

#### d. La déviation immune

Carballido *et al.* ont démontré qu'une dose croissante d'antigène permet de changer la production cytokinique des LT CD4<sup>+</sup> passant d'un profil Th1 (production d'IFN- $\gamma$ ) à un profil Th2 (production d'IL-4) (141). Dans plusieurs maladies auto-immunes, une réponse de type Th1 est impliquée dans la pathogénicité alors qu'une réponse de type Th2 confère une résistance à la pathologie (142). La déviation immune permettrait de réorienter une réponse agressive vers un phénotype moins délétère pour l'organisme.

## 2. Les acteurs de la tolérance récessive

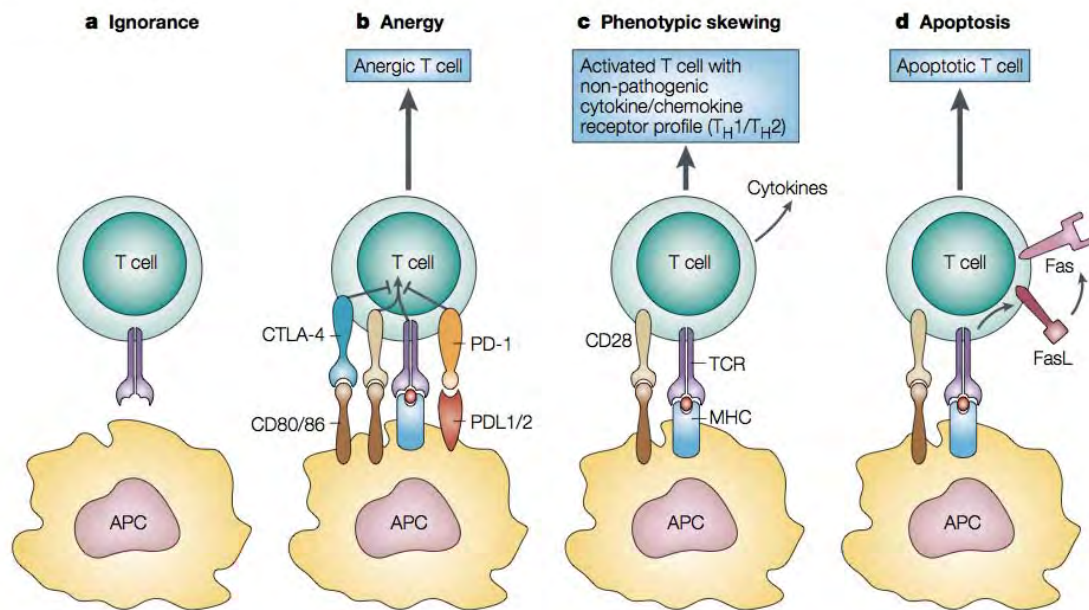
#### a. Les DC tolérogènes

Les DC périphériques vont non seulement induire des réponses immunitaires mais elles sont également impliquées dans l'induction et le maintien de la tolérance périphérique. Les DC tolérogènes fournissent uniquement le signal 1 lors de l'interaction avec des LT inhibant ainsi leur activation et leur prolifération. Les DC tolérogènes sont générés par une maturation incomplète. En effet, Hawiger *et al.* ont démontré que les cellules apoptotiques contrairement aux cellules nécrotiques conduisent à l'activation partielle des DC. Ces DC expriment PDL-1 et PDL-2 impliqués dans l'induction d'anergie. Des DC tolérogènes peuvent également être induites par différentes molécules anti-inflammatoires et/ou immuno-suppressives notamment la rapamycine, les corticostéroïdes, l'IL-10 et le TGF- $\beta$  (143). Les DC tolérogènes peuvent également induire des LT régulateurs qui sont impliqués dans la tolérance dominante (voir plus loin).



## b. Les cellules stromales des nœuds lymphatiques

Longtemps considéré comme ayant uniquement un rôle de parenchyme pour soutenir des LT, il a été récemment mis en évidence que différentes sous-populations expriment des TSA (144) et peuvent induire des phénomènes de tolérance (voir plus loin).



**FIGURE 8: Mécanismes de tolérance périphérique**

(a). La séquestration d'antigènes au niveau de certains tissus vont empêcher l'activation des lymphocytes T spécifiques de ces auto-antigènes. (b) Les cellules dendritiques peuvent induire l'anergie des cellules auto-spécifiques par un mécanisme impliquant CTLA-4 et PD-1. (c) Des lymphocytes T auto-spécifiques peuvent d'activer mais adoptent un phénotype moins délétère pour l'organisme en terme de cytokines produites et n'induisent pas d'auto-immunité. (d) L'interaction des LT auto-spécifiques avec leur antigènes peut conduire à l'apoptose de ces cellules par AICD (activation induced cell death). Ce mécanisme dépend de l'expression de Fas et FasL par les lymphocytes T.

APC: antigen-presenting cells; CTLA-4:cytotoxic T lymphocyte antigen 4; MHC major histocompatibility complex, PD-1: Programmed cell death 1

D'après Walter *et al.*(145)

### III- La tolérance dominante

La tolérance dominante est définie comme celle qui est transmissible par une sous-population cellulaire d'un donneur devenu tolérant à un hôte immunocompétent (146). Elle implique principalement les lymphocytes T régulateurs qui vont activement inhiber l'action des LT auto-spécifiques.

#### 1. From the 'S' word to the 'R' word

Le concept d'une immuno-régulation par des lymphocytes T est né à la fin des années 60. Nishizuka et Sakakura ont démontré que la thymectomie des souris BALB/c trois jours après leur naissance conduit à l'atrophie des ovaires. A l'époque, cette dysgénésie était perçue comme étant due à une carence en hormones d'origine thymique et non à une réponse inflammatoire auto-immune (147). Plus tard, Gershon et Kondo démontrèrent que des lymphocytes isolés du thymus peuvent inhiber la co-opération entre les lymphocytes T et B et ainsi la production d'anticorps contre des antigènes exogènes (148). Lors de leurs expériences, des souris athymiques ont été irradiées puis reconstituées avec de la moelle osseuse et des thymocytes syngéniques. Ces souris chimériques ont ensuite été immunisées avec des globules rouges de mouton. Ceci a, comme attendu, conduit à la production d'allo-anticorps spécifiques des globules rouges exogènes. Par contre, une seconde injection de thymocytes syngéniques, avant une nouvelle immunisation avec les globules rouges de mouton, limitait la production d'allo-anticorps. Cette tolérance induite par les lymphocytes T étant transmissible d'une souris à une autre, les auteurs ont décrit ce phénomène comme une « tolérance infectieuse » et les lymphocytes T 'tolérisants' comme des lymphocytes T suppresseurs (149). Par la suite, d'autres équipes ont démontré que la thymectomie des souris induit l'apparition de maladies auto-immunes comme des gastrites, des thyroïdites et des diabètes de type I (150-153). Ces travaux ont contribué à l'émergence du concept que des lymphocytes issus du thymus peuvent réguler la réponse immunitaire contre des antigènes du soi.

Historiquement, les premiers lymphocytes suppresseurs qui ont été décrits étaient des LT exprimant le co-récepteur CD8. En effet, Cantor *et al.* ont identifié une population de lymphocyte T exprimant la molécule de surface Lyt2T (connu maintenant comme le CD8 $\alpha$ ) capable d'inhiber une réponse immunitaire de façon antigène-spécifique (154, 155). D'autres populations de T suppresseurs ont ensuite été mises en évidence. A la fin des années 80, Sakaguchi *et al.* ont démontré que les LT CD4<sup>+</sup>Ly1<sup>high</sup> (CD5<sup>high</sup>) peuvent inhiber le développement de maladies auto-immunes induit par l'injection de CD4<sup>+</sup>CD5<sup>low</sup> chez des souris BALB/c athymiques (152). Durant la même période, Powrie *et al.* ont mis en évidence

que l'injection de splénocytes déplétées en LT  $CD4^{+}OX22^{low}(CD45RB^{low})$  induit le développement d'un syndrome auto-immun chez des rats athymiques (156).

La fonction régulatrice de ces lymphocytes T suppresseurs  $CD8^{+}$  était attribuée à l'expression d'un facteur soluble par ces cellules, la protéine I-J, responsable de l'inhibition des autres cellules immunitaires. Le locus I-J était sensé se trouver entre I-A et I-E (157, 158). Le clonage et le séquençage de ce prétendu locus n'ayant pas abouti à la mise en évidence d'un gène transcrit, le concept des lymphocytes T suppresseurs est tombé dans l'oubli (159, 160).

Dans les années 90, plusieurs équipes ont contribué au renouveau des lymphocytes T suppresseurs/régulateurs. L'équipe de Waldmann fut la première à démontrer, en 1993, le phénomène de tolérance infectieuse dans un modèle de transplantation (161). Sakaguchi *et al.* ont démontré en 1995 que les lymphocytes T  $CD4^{+}$  exprimant la chaîne  $\alpha$  du récepteur à l'IL2 (CD25) peuvent inhiber le développement de maladies auto-immunes (162). Cette population de LT  $CD4^{+}CD25^{+}$  apparaissent en périphérie qu'à partir de 3 jours postnatal (163). Ainsi la thymectomie des souris avant ce temps là conduit à l'absence de cette population en périphérie et aux phénomènes auto-immuns observés par Nishizuka et Sakakura vingt ans plus tôt.

En 2003, trois équipes indépendantes ont démontré que le facteur de transcription Forkhead Box Protein 3 (Foxp3) est nécessaire pour l'acquisition des capacités régulatrices de ces lymphocytes T  $CD4^{+}CD25^{+}$  (164-166). Pour faire la scission avec son lourd passé, les lymphocytes T avec des capacités immunosuppressives furent nommés T régulateurs (Treg). Depuis la recherche sur les Tregs connaît un intérêt croissant parmi les immunologistes et les cliniciens.

## 2. Les Treg $CD4^{+}Foxp3^{+}$

### a. De la souris scurfy au syndrome IPEX

En 1949, suite à des mutations spontanées, une lignée de souris a surgi au sein d'une colonie murine au laboratoire Oak Ridge National aux Etats-Unis. Ces souris avaient une peau squameuse, des yeux ensanglantés, présentaient une splénomégalie et mourraient prématurément (au bout de 3 semaines). Elles furent nommées Scurfy à cause de la nature écailleux de leur peau (167). Godfrey *et al.* ont été les premiers à mettre en évidence le caractère auto-immun de la pathologie responsable de la mort des souris scurfy (168). Par la suite, Brunkow *et al.* ont démontré que les mutations dans le gène *Foxp3* au niveau du chromosome X sont responsables du phénotype scurfy (169). La souris scurfy fut le premier cas de maladie auto-immune liée à l'X à être décrit chez la souris et dont la cause est une

mutation récessive. Vu que les atteintes chez les souris mâles scurfy présentaient plusieurs similitudes avec un syndrome auto-immun, IPEX (Immune-Dysfunction, polyendocrinopathy, enteropathy, X-linked), lui aussi létal chez l'Homme (170), Bennet *et al.* ont séquencé le gène *Foxp3* chez des patients atteints de ce syndrome ainsi que chez des membres de leur famille. Au sein de l'échantillon initial de 200 chromosomes X séquencés, toute mutation dans *Foxp3* furent associée à l'IPEX (171).

#### b. *Foxp3* : LE facteur de transcription des Treg CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>

Khattari *et al.* ont observé que plus l'expression de *Foxp3* est augmentée chez leur souris transgéniques, plus la population de LT périphérique est réduite. De plus, les cellules qui subsistent sont hypo-réactives à plusieurs stimuli et expriment constitutivement le CD25 (172). Cette étude, combiné aux travaux de Sakaguchi *et al.* qui ont mis en évidence le caractère régulateur des LT CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> (162), a poussé plusieurs équipes à analyser l'expression de *Foxp3* au niveau de ces cellules. En 2003, les équipes de Sakaguchi, Rudensky et Ramsdell ont montré, à travers trois publications différentes, que le facteur de transcription *Foxp3* contrôle le développement et la fonction régulatrice des Treg CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> (162, 164, 166). L'utilisation de souris transgéniques exprimant la protéine fluorescente GFP (Green Fluorescent Protein) a démontré d'une part que l'expression de *Foxp3* corrèle avec la capacité régulatrice des LT indépendamment de l'expression de CD25 et d'autre part que les Treg CD4<sup>+</sup>*Foxp3*<sup>+</sup> sont un lignage distinct de LT impliqué dans le maintien de la tolérance périphérique (173). L'ablation spécifique des cellules exprimant *Foxp3* conduit à une pathologie lymphoproliférative létale soulignant l'importance de ces cellules dans le maintien de l'homéostasie immunitaire (174).

#### c. Développement thymique des Treg *Foxp3*<sup>+</sup>

Les LT CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> périphériques reconnaissent préférentiellement les antigènes du soi que ceux du non-soi (175). Lors de transferts adoptifs dans des souris syngéniques, les LT exprimant des TCR provenant de Tregs présentent un niveau d'activation et de prolifération supérieure à celui des LT exprimant des TCR provenant de Tconv (176). Ainsi, le répertoire des Treg *Foxp3*<sup>+</sup> est enrichi en cellules auto-spécifiques ce qui est en cohérent avec leur fonction d'inhibition de maladies auto-immunes. Cette particularité du répertoire des Treg *Foxp3*<sup>+</sup>, qui est distinct des Tconv, a soulevé plusieurs interrogations concernant le développement thymique de ces cellules. En effet, comment expliquer le fait que le thymus va d'un coté éliminer les Tconv auto-spécifiques et de l'autre favoriser l'enrichissement des Tregs en cellules spécifiques pour les antigènes du soi ?

les Treg Foxp3<sup>+</sup> se développent dans des souris où l'expression du CMH II est restreinte qu'au niveau des cTEC, cellules qui interagissent préférentiellement avec les thymocytes DP (177). Ainsi, tout comme leurs homologues conventionnels, les précurseurs des Treg CD4<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> passent eux aussi par une étape de sélection positive au niveau du cortex. En ce qui concerne la sélection négative, Romagnoli *et al.* ont démontré que l'absence de CMH II au niveau des cellules dendritiques conduit à une augmentation de la proportion thymique des Treg CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>(Foxp3<sup>+</sup>) ainsi que des Tconv CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> (175). Ces Treg sont donc sensibles à la délétion par les DC. Le rôle des mTEC Aire<sup>+</sup> dans la sélection des Treg Foxp3<sup>+</sup> est discuté dans le chapitre suivant.

#### d. Facteurs impliqués dans la différenciation des Treg Foxp3<sup>+</sup>

##### *La signalisation TCR*

Les variations dans l'intensité et la durée du signal ont été proposées comme étant les facteurs déterminants dans le choix de lignage CD4<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>. L'expression d'un ligand agoniste pour un récepteur transgénique conduit à la génération de Treg Foxp3<sup>+</sup> exprimant ce TCR transgénique. Par contre, l'expression d'un TCR transgénique ayant une affinité moins élevée pour ce même ligand ne permet pas la génération de Treg Foxp3<sup>+</sup> (178). Les LT transduits avec des TCR provenant de Treg présentent une expansion homéostatique plus rapide dans des receveurs lymphopéniques que ceux transduits avec des TCR provenant de Tconv, ce qui conforte l'hypothèse que les Treg reconnaissent les antigènes du soi avec une haute affinité (176). Hinterberger *et al.* ont démontré que l'atténuation de l'expression des molécules de CMH II au niveau des mTEC diminue l'efficacité de la sélection négative et conduit à une augmentation de la proportion de Treg CD4<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> (109). L'ensemble de ces données suggère que le choix de lignage de cette population régulatrice est instruit par des TCR qui vont interagir avec des complexes CMH-peptides du soi avec une durée et une intensité intermédiaire entre la sélection positive et la sélection négative. D'autres molécules associées au TCR sont également nécessaires au développement thymique des Treg CD4<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>. Les souris déficientes pour CD28 ou pour ses ligands CD80/CD86 présentent de plus faibles proportions de Treg que les souris sauvages soulignant l'importance de la co-stimulation lors du développement de ces cellules (179, 180).

Cependant ce modèle instructionnel basé sur la signalisation du TCR a été remis en question par plusieurs autres études. En effet, Shih *et al.* ont démontré que chez les souris double-transgéniques exprimant à la fois l'antigène du soi glucose-6-phosphate-isomerase (GPI) et des lymphocytes T avec un TCR spécifique de GPI, il y avait une forte délétion des Treg et des Tconv (181). Pennington *et al.* ont quant à eux démontré que des évènements

survenus au stade DN (où le TCR n'est pas encore exprimé) va influencer la différenciation des thymocytes en lymphocytes régulateurs ou conventionnels par un processus appelé *trans*-conditionnement (182). Ainsi, des facteurs autres que la signalisation du TCR est impliqué dans la différenciation des Treg Foxp3<sup>+</sup>

### *Les cytokines*

En ce qui concerne les cytokines impliqués dans la différenciation thymique des Treg Foxp3<sup>+</sup>, Fontenot *et al.* ont démontré que les souris déficientes pour la chaîne- $\gamma$  n'ont pas de Treg Foxp3<sup>+</sup> (183). Parmi la famille des cytokines à chaîne- $\gamma$ , il semblerait que l'IL-2, IL-7 et l'IL-15 soient impliqués dans la génération des Treg Foxp3<sup>+</sup> (184). Plus récemment, Konkel *et al.* ont démontré que le TGF- $\beta$  est également nécessaire à l'induction de Foxp3 et à la génération thymique des Treg Foxp3<sup>+</sup> (185).

#### *e. Développement extrathymique de Treg Foxp3<sup>+</sup>*

Des Tregs Foxp3<sup>+</sup> peuvent également être induits en périphérie à partir du pool des Tconv. Contrairement à son développement thymique qui est hautement régulé par le microenvironnement, l'induction périphérique peut se faire sous différentes conditions, préférentiellement au niveau des interfaces environnementales comme l'intestin (186). Suivant leur origine, on peut donc définir deux populations de Treg CD4<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> : les Treg dit naturels (nTreg) qui se développent au niveau du thymus à partir des précurseurs hématopoïétiques des LT et les Treg induits (iTreg) qui eux se différencient à partir des Tconv.

*In vitro*, la stimulation des LT CD4<sup>+</sup>Foxp3<sup>-</sup> avec des ligands du TCR en présence d'IL-2 et du TGF- $\beta$  induit l'expression de Foxp3. (187-189). *In vivo*, l'administration d'antigènes exogènes conduit à la différenciation des Tconv CD4<sup>+</sup>, ayant une haute affinité pour ces antigènes, en iTreg CD4<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>. L'administration chronique de faible doses d'antigènes agonistes induit des iTregs capables de contrôler des réponses allergiques et auto-immunes (190, 191). La présentation antigénique par des DC immatures (tolérogènes) peut également induire des iTreg.

Le domaine CNS1 du gène *Foxp3* semble être essentielle au développement des iTregs. Josefowicz *et al.* ont récemment démontré que les souris déficientes pour CNS1 présentent une proportion normale de Treg CD4<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> thymique mais un nombre réduit de Treg au niveau intestinal et pulmonaire. Les souris déficientes pour CNS1 ne présentent pas de syndrome auto-immun. Par contre, elles développent des inflammations de type Th2 aux



niveau des muqueuses (192). Ainsi, il semblerait donc que les nTreg suffisent à prévenir les réactions auto-immunes systémiques alors que les iTreg sont eux spécialisés dans le contrôle des réponses immunitaires au niveau des muqueuses.

#### f. Mécanisme d'action de Foxp3

L'analyse de la structure de Foxp3 a mis en évidence plusieurs domaines essentiels à sa fonction. Son domaine Forkhead lie directement NFAT (Nuclear Factor for Activated T cells) et cette interaction est nécessaire pour l'activation ou l'inhibition de la transcription par Foxp3 (193). Son domaine répresseur en N-terminal recrute, *via* Eos, un complexe de remodelage de chromatine constitué de l'histone déacétylase 7 et 9 (HDAC7 et HDAC9) et de l'histone acétyltransférase KAT5. Ceci est important pour la répression transcriptionnelle par Foxp3 (194-196). Son domaine glissière à leucine permet le recrutement de RUNX1 et est également nécessaire pour la répression des gènes (197). L'analyse de l'interactome de Foxp3 a mis en évidence plus de 300 protéines partenaires directes ou indirectes de ce facteur de transcription (198). La recherche au niveau du génome entier des domaines de liaisons de Foxp3 a révélé qu'environ 700 gènes différents sont régulés positivement ou négativement par Foxp3 (199, 200). L'ensemble de ces résultats propose un modèle où Foxp3 va agir comme répresseur et activateur de la transcription.

#### g. Régulation de l'expression de Foxp3

Trois régions non-codantes conservées (CNS1-CNS3) ont été identifiées au niveau du gène *Foxp3*. Chaque CNS va recruter des facteurs de transcription différents nécessaires à la transcription du gène. CNS2 et CNS3 sont essentielles à l'induction de l'expression de Foxp3 lors de la différenciation thymique des Treg. La liaison de Rel, membre de la famille de NF- $\kappa$ B, au CNS3 permet 'l'ouverture' de la région promoteur/enhancer de *Foxp3* (201-204). Ceci va permettre le recrutement des autres éléments régulateurs, CREB (cyclic AMP-responsive element binding), STAT5 et le complexe RUNX-CBF $\beta$  ( runt- related transcription factor 1– core-binding factor subunit- $\beta$  complex) au niveau du CNS2 (205) afin d'initier la transcription, maintenir et stabiliser l'expression de Foxp3 (206). En ce qui concerne le CNS1, il recrute SMAD3, le récepteur à l'acide rétinoïque (RAR), le récepteur au rétinoïde X (RXR), NFAT et AP-1 et semble nécessaire à la génération extrathymique des Treg CD4<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> (203). La stabilité de phénotype régulateur est fonction de la méthylation de la région TSDR (Treg-specific-demethylated region) du promoteur de Foxp3. Cette région est hypométhylée chez les Treg et hyperméthylée chez les lymphocytes T conventionnels (207).

## h. Rôle des Treg CD4<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> en physio(patho)logie

### *Prévention de l'auto-immunité*

Le syndrome auto-immun léthal dont souffrent les patients et les souris déficients en Treg suite à des mutations dans *Foxp3* souligne l'importance de ces cellules dans la prévention de l'auto-immunité (203). Huan *et al.* ont démontré que les LT CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> provenant de patients souffrant de sclérose en plaque expriment moins de Foxp3 que ceux provenant de sujets sains. Cette diminution d'expression corrèle avec la perte de fonction de ces cellules (208). Des défauts similaires dans la fonction suppressive des Treg CD4<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> ont également été mis en évidence chez des patients souffrant de maladies auto-immunes notamment la polyarthrite rhumatoïde, le psoriasis, le diabète de type I, la myasthénie grave et la sclérose en plaque.(209-213). Cependant, il est important de noter que la plupart de ces études démontre uniquement une faible altération des capacités immunosuppressives des Treg CD4<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>. De plus, la majorité des travaux réalisés chez l'humain utilisait le CD25 et Foxp3 comme marqueur de la population régulatrice. Or, l'activation des LT CD4<sup>+</sup> conventionnels conduit à l'induction de l'expression de Foxp3 sans que cela soit associé avec l'acquisition de capacités immunosuppressives (214-216). En absence de marqueurs plus fiables pour cette population régulatrice, les travaux sur les défauts fonctionnels des Treg CD4<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> chez l'Homme restent controversés.

### *Tolérance fœto-maternelle*

Après implantation de l'ovule fertilisée au niveau de l'utérus, s'en suit une période de maintenance durant laquelle le système immunitaire de la mère va tolérer les antigènes fœtaux d'origine paternelle (217). Durant la grossesse, les Treg Foxp3<sup>+</sup> maternels contribuent à la maintenance de la tolérance en inhibant les réponses alloréactives maternelles dirigées contre les structures paternelles des cellules fœtales (218). Teles *et al.* ont récemment démontré que les Treg Foxp3<sup>+</sup> interviennent également lors de l'implantation de l'embryon en inhibant la mise en place d'un microenvironnement utérin hostile (219). Ainsi, les Treg Foxp3<sup>+</sup> ont une double fonction lors de la grossesse en favorisant d'une part l'implantation fructueuse de l'embryon et d'autre part l'allo-tolérance envers les antigènes d'origine paternelle.

### *Contrôle des réponses infectieuses*

Dépendant de l'infection, les Treg Foxp3<sup>+</sup> peuvent soit jouer un rôle protecteur ou délétère. Lors d'infection par LCMV, HSV2 (Herpes Simplex Virus 2) ou le virus du West Nile, les Treg vont protéger l'organisme d'une immuno-pathologie létale tout en permettant



au système immunitaire d'éliminer le pathogène. En effet, la déplétion de Treg lors de ces infections conduit à une charge virale plus importante qui sera finalement létale à l'organisme (220, 221). Les Treg ont également un rôle protecteur similaire lors d'infections par des parasites comme *P.berghie* et *T.gondii* (222, 223). En revanche lors d'infections par certaines bactéries notamment, *L.monocytogenes*, *S.enterica* et *M.tuberculosis*, l'expansion ou le transfert adoptif de Treg Foxp3<sup>+</sup> va augmenter la charge bactérienne et contribuer à la mise en place d'une infection chronique (224-226). Ici, une immuno-régulation excessive par les Treg va favoriser l'échappement du pathogène à la réponse infectieuse.

### *Inhibition de l'immunité anti-tumorale*

Les Treg Foxp3 sont des puissants inhibiteurs de la réponse anti-tumorale et leur accumulation est généralement un mauvais pronostic dans les carcinomes humains (227, 228). Les Treg Foxp3 vont induire l'apoptose de cellules dendritiques au niveau des nœuds drainants la tumeur inhibant ainsi le priming des LT CD8<sup>+</sup> (229). Ils peuvent également stimuler la progression métastatique en activant la voie de signalisation RANK (Receptor Activator of Nuclear factor Kappa-B) (230).

### *Contrôle des réponses immunitaires au niveau des muqueuses*

Les patients atteints d'IPEX souffrent entre autres d'inflammation intestinale et de réponses allergiques aberrantes suggérant un rôle des Treg Foxp3<sup>+</sup> dans le maintien de l'homéostasie immunitaire au niveau des muqueuses (231). Dans le modèle colite expérimentale le plus utilisé, l'inflammation intestinale est induite en injectant des LT CD4<sup>+</sup> naïfs dans des souris immunodéficientes (Rag<sup>o</sup> ou SCID). La co-injection de Treg Foxp3<sup>+</sup> avec les LT colitogènes prévient la pathologie. Cette protection est dépendante d'une production d'IL-10 par les Treg (232). Les souris présentant une ablation spécifique de l'*IL10* au niveau de Treg Foxp3<sup>+</sup> développent spontanément une colite avec l'âge. Le rôle de Treg Foxp3<sup>+</sup> dans le contrôle des réponses allergiques est discuté dans le dernier chapitre (voir plus loin).

### *Tolérance aux allogreffes*

Chez les sujets ayant accepté une greffe d'organe, le nombre de Treg Foxp3 dans le sang et au niveau du greffon est supérieur à celui des sujets ayant rejeté la greffe (233-236). Ceci suggère fortement un rôle important de ces cellules dans le maintien de la tolérance. Joffre *et al.* ont démontré que le transfert adoptif de Tregs CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> spécifiques du greffon induit une tolérance à long terme d'une allogreffe de moelle osseuse, cœur ou de peau (237).

L'activité immunosuppressive de Tregs semble être nécessaire non-seulement au niveau du greffon mais également au niveau des nœuds lymphatiques drainants (238-240).

### i. Mécanismes d'action des Treg Foxp3<sup>+</sup>

#### *Production de cytokines inhibitrices*

Les Tregs exercent leurs fonctions à travers différents mécanismes. Ils produisent des cytokines immuno-modulatrices tels que l'IL-10, le TGF- $\beta$  et l'IL-35 qui sont impliquées dans le maintien de l'homéostasie immunitaire ainsi que dans le contrôle de l'inflammation au niveau du SNC, de l'intestin et des poumons (232, 241, 242).

#### *Cytolyse*

Les Treg peuvent également induire la cytolyse des cellules effectrices via différents mécanismes impliquant entre autres le granzyme B, TRAIL et la galectine-1 (243-245). Ce mécanisme permet l'élimination des NK et des LT CD8<sup>+</sup> cytotoxiques au niveau de tumeurs (246). Il est également impliqué dans l'induction d'une tolérance lors de la transplantation.

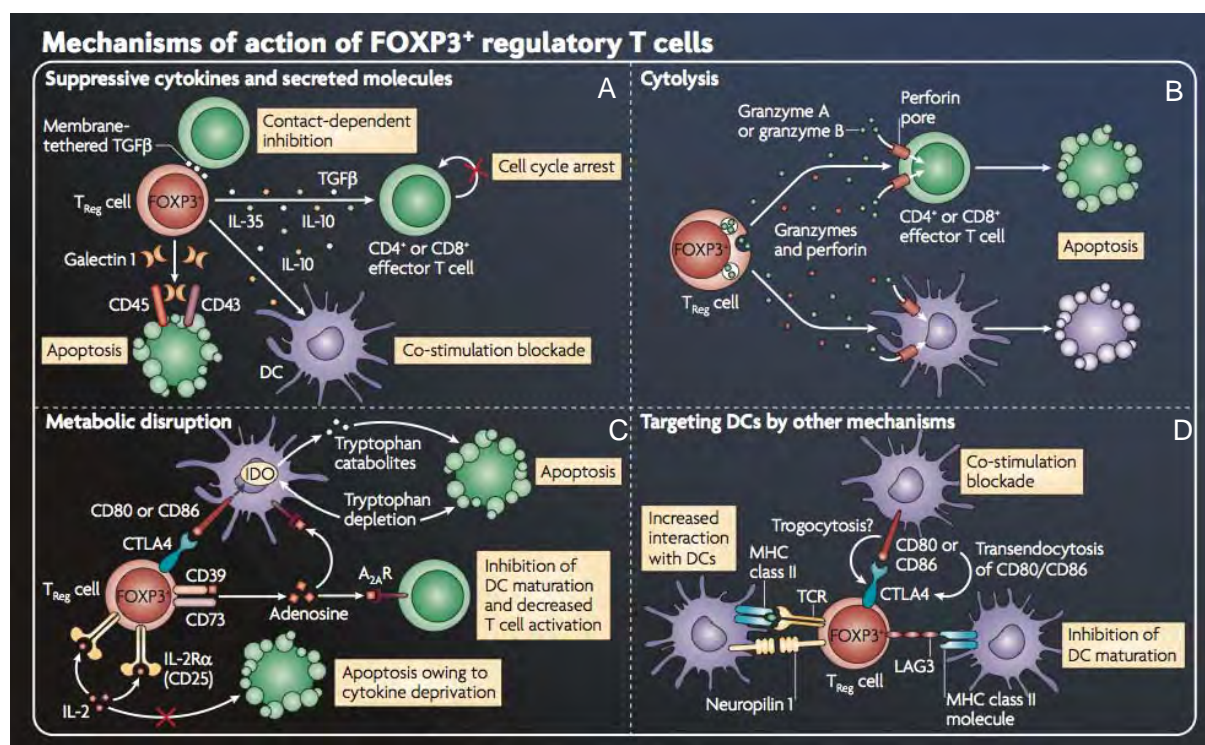
#### *Inhibition des cellules dendritiques*

L'expression de CTLA-4 et de LAG3 permet au Treg Foxp3<sup>+</sup> d'inhiber la maturation des DC (247, 248). Récemment, Sarris *et al.* ont démontré que l'expression de la neuropiline par les Treg Foxp3<sup>+</sup> permet l'interaction prolongée de ces cellules avec des DC immatures. L'absence de l'expression de la neuropiline par les LT conventionnels confère ainsi un avantage au Treg Foxp3<sup>+</sup> qui vont interagir préférentiellement avec les DC au détriment des autres LT (249).

#### *Altération du métabolisme*

La forte expression de CD25 par les Treg conduit à la déprivation du milieu en IL-2 ce qui va induire l'apoptose de LT conventionnels (250). Les Tregs peuvent également transférer l'AMP cyclique via les jonctions serrées aux LT conventionnels (251). Ceci va inhiber la prolifération et la production d'IL-2. L'expression concomitante des ectoenzymes CD39 et CD73 par les Tregs qui vont permettre la synthèse de l'adénosine. La fixation de cette dernière sur son récepteur A<sub>2A</sub>R (Adenosine receptor 2A) va inhiber l'action des LT conventionnels (252). Sous l'action des Treg, les DC se mettent à produire l'enzyme IDO (Indoleamine 2,3-dioxygénase) qui va d'une part dégrader le tryptophane nécessaire à

l'activité des LT conventionnels et d'autre part conduire la production de kynurénine, une molécule pro-apoptotique (253).



**FIGURE 9: Mécanismes suppresseurs des Treg CD4<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>**

(A-C) La sécrétion de cytokines immuno-modulatrices (IL-10, IL-35, TGF- $\beta$ ) et d'autres molécules telles que l'adénosine par les Treg va inhiber la maturation des cellules dendritiques (DC) et les fonctions effectrices des lymphocytes T conventionnels (Tconv). Les Treg sont également capables d'induire l'apoptose des DC et des Tconv *via* la sécrétion de galectine 1, les granzymes A et B et la perforine. (C) L'interaction entre CTLA4 au niveau des Treg et de CD80/86 au niveau des DC va aboutir à la sécrétion d'IDO. Cette enzyme va dégrader le tryptophane, acide aminé essentiel à la survie de Tconv, présent dans le microenvironnement. Le catabolisme du tryptophane conduit à la production de la kynurénine qui est un facteur pro-apoptotique. (D) L'expression de la neuropiline par les Treg activés permet une interaction prolongée de ces cellules avec les DC. L'engagement de d'autre molécules membranaires telles que CTLA-4 et LAG3 va inhiber l'activation de la DC.

A<sub>2A</sub>R: adenosin receptor 2; CTLA-4: cytotoxic T lymphocyte antigen 4; DC: dendritic cells; IDO: indoleamine-2,3-dioxygenase

D'après Shevach *et al.* (Treg poster for Nature Review Immunology 2010)

### 3. Les Treg CD8<sup>+</sup>

Mise à part les Treg CD4<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> qui constituent la population de Treg la plus étudiée et la mieux caractérisée à ce jour, plusieurs études ont également mis en évidence des populations immunosuppressives au sein des LT CD8<sup>+</sup> que ce soit chez la souris ou chez l'Homme en conditions physiologiques ou lors de différents types de pathologies.

#### Les Tregs CD8<sup>+</sup>CD122<sup>high</sup>

Les souris déficientes pour la chaîne  $\beta$  du récepteur à l'IL-2 (CD122) développent une immuno-pathologie caractérisée par l'accumulation spontanée de LT activés au niveau des tissus et la différenciation anormale des LB en cellules plasmacytoïdes (254). Le transfert adoptif des LT CD8<sup>+</sup>CD122<sup>high</sup> ou LT CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup> chez ces souris prévient l'activation anormale de lymphocytes (255). Les Treg CD8<sup>+</sup>CD122<sup>high</sup> peuvent également prévenir la pathologie dans différents modèles d'auto-immunité ou de maladies inflammatoires tels que l'encéphalo-myélite auto-immune expérimentale (EAE, modèle de la sclérose en plaque), la myasthénie grave et la colite expérimentale (modèle des maladies inflammatoires de l'intestin) (256-258). Récemment, Dai *et al.* ont démontré qu'une sous-population de LT CD8<sup>+</sup>CD122<sup>high</sup> exprimant PD1 inhibe le rejet de greffes de peau allogéniques (259).

La capacité régulatrice des Treg CD8<sup>+</sup>CD122<sup>high</sup> semble être médiée exclusivement par la production d'IL-10 car une déficience en cette cytokine ou l'utilisation des anticorps anti-IL-10 neutralise cette capacité aussi bien *in vitro* qu'*in vivo*. Ces cellules, qui n'expriment pas Foxp3<sup>+</sup> et produisent des quantités importantes d'IL-10, sont considérées comme étant les homologues des Tr1 (voir plus loin) parmi la population des LT CD8<sup>+</sup>.

Chez l'homme, l'équipe de Suzuki a identifié une population de cellules CXCR3<sup>+</sup> parmi les LT CD8<sup>+</sup> présentant des similitudes avec Treg CD8<sup>+</sup>CD122<sup>high</sup> murins dans leur capacité à inhiber l'activation des LT *in vitro* (260). A ce jour l'origine (thymique ou périphérique) des Treg CD8<sup>+</sup>CD122<sup>high</sup> ou de leur homologues chez l'Homme n'est pas connu.

#### Les Tregs CD8<sup>+</sup> restreints à Qa-1

Les premières évidences d'une capacité régulatrice des LT CD8<sup>+</sup> restreints au CMH non-classique Qa-1 proviennent des travaux de l'équipe de Cantor. Cette-dernière a démontré que des LT CD8<sup>+</sup> restreints à Qa-1 peuvent inhiber efficacement l'aide des LT aux LB (154, 261, 262). Par la suite, plusieurs études ont démontré le rôle immuno-modulateur de ces Treg dans différents modèles murins tel que l'EAE, le diabète de type 1 et la kératite induite par HSV (263-266). Dans ces modèles, les Tregs CD8<sup>+</sup> vont interagir avec Qa-1 au niveau des LT

pathogènes et induire l'apoptose de ces cellules. La perforine et l'interféron (IFN)- $\gamma$  sont nécessaires à cette induction d'apoptose (267). L'analyse phénotypique de cette population régulatrice a démontré qu'elle est TCR $\alpha\beta^+$ CD8 $\alpha\alpha^+$ . Ces cellules expriment également CD28, CD25, CD122, l'IL-7R et CD94 (268). Récemment, Kim *et al.* ont démontré que les Treg CD8 $^+$  restreints à Qa-1 interagissent préférentiellement avec les LT folliculaires (Tfh). En effet, en conditions physiologiques, cette sous-population de LT CD4 $^+$  exprime des niveaux élevés de Qa-1 faisant d'eux les cibles privilégiées des Treg CD8 $^+$ . Des défauts dans cette interaction induisent un syndrome ressemblant au lupus chez la souris (269). Les souris déficientes pour la molécule de CMH non-classique Qa-1 ont une susceptibilité accrue à l'induction de l'EAE et induisent des réponses T-CD4 $^+$  aberrantes suite à des infections virales ou des immunisations avec des antigènes (263). Ceci démontre l'importance de Qa-1 dans l'immuno-régulation *in vivo*.

L'homologue humain de cette population régulatrice est les LT CD8 $^+$  restreint au HLA-E. De façon intéressante, des défauts dans la capacité immunosuppressive des CD8 $^+$  restreints à HLA-E ont été mis en évidence chez des patients souffrant de sclérose en plaque ou de diabète de type I (270, 271).

#### Les Treg CD8 $^+$ CD103 $^+$

CD103 est une intégrine ( $\alpha E\beta 7$ ) qui reconnaît E-cadhérine au niveau des cellules épithéliales. Uss *et al.* ont démontré que les CD8 $^+$ CD103 $^+$  humains possèdent une capacité régulatrice (272). Après stimulation allogénique, ces cellules inhibent la prolifération dans des « mixed lymphocyte reaction » (MLR). Ces Treg qui sont majoritairement des cellules CD28 $^+$  n'expriment pas CD25, Foxp3, LAG-3 et GITR (273). Elles produisent de l'IL-10 et du TGF- $\beta$  mais ces cytokines ne sont pas impliquées dans leur fonction régulatrice *in vitro* (274). Chez la souris, une population homologue de Treg CD8 $^+$ CD103 $^+$  prévient l'inflammation intestinale et le rejet de greffe. Dans les deux cas, cette protection est dépendante d'une production de TGF- $\beta$  par ces cellules (275, 276).

#### Les Tregs CD8 $^+$ CD25 $^+$ Foxp3 $^+$

Bienvenu *et al.* ont mis en évidence une population de LT CD8 $^+$ CD25 $^+$  chez les souris déficiente pour le CMH-II. Ces cellules qui sont retrouvées dans le thymus et en périphérie présentent plusieurs similitudes avec les LT CD4 $^+$ CD25 $^+$ . En effet, elles expriment GITR, Foxp3, CTLA4 et sont capables d'inhiber l'activation des LT CD4 $^+$  conventionnels (277).

Cosmi *et al.* ont identifié une population de Treg CD8 $^+$ CD25 $^+$  thymiques chez l'Homme capables d'inhiber la prolifération des LT allospécifiques de façon contact dépendant. Ces



cellules expriment constitutivement TNFR2, CCR8 et la stimulation avec des anticorps anti-CD3 et anti-CD28 induit l'expression de CTLA-4 et du TGF- $\beta$  par ces cellules (278). Ces cellules ont également de transcrits de Foxp3 même si peu d'entre elles expriment la protéine.

Une population similaire de Treg peut être induite en stimulant des CD8<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> sanguins avec des agents mitogènes ou des antigènes (279, 280). Mahic *et al.* ont démontré que la stimulation des cellules CD8<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> avec l'enterotoxine B de *Staphylococcus* induit l'expression de CD25, Foxp3, GITR, CD28, CTLA-4 ainsi que des molécules cytolytiques granzyme A, B et la perforine (280). Cette population induite inhibe la prolifération des Tconv. A noter que des CD8<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> présentant des propriétés similaires à ceux générés *in vitro* sont retrouvés chez des patients diabétiques traités avec un anti-CD3 et chez des patients souffrant de sclérose en plaque (281, 282).

Chez la souris, Westendorf *et al.* ont observé une augmentation dans la proportion des cellules CD8<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> dans les nœuds lymphatiques drainants dans un modèle murin d'inflammation autoimmune intestinale. Ce modèle repose sur l'utilisation de souris exprimant l'hémagglutinine (HA) de façon ectopique au niveau de l'intestin et possédant des LT dont le TCR transgénique est spécifique de HA. Les LT CD8<sup>+</sup> spécifiques de HA, isolés des nœuds lymphatiques mésentériques, expriment des niveaux élevés de CD103, LAG-3, CTLA-4 et CCL4 et inhibent *in vitro* la prolifération des Tconv (283).

### Les Treg CD8<sup>+</sup>CD11c<sup>+</sup>

La capacité régulatrice des LT CD8<sup>+</sup>CD11c<sup>+</sup> a été mise en évidence pour la première fois dans un modèle d'arthrite induite par collagène (AIC). Seo *et al.* ont démontré que dans ce modèle, les LT CD8<sup>+</sup>CD11c<sup>+</sup>, préalablement stimulés avec le collagène II (CII), inhibent l'activation des LT CD4<sup>+</sup> spécifiques de CII et préviennent l'AIC. Cette protection dépend de l'IFN- $\gamma$  et de l'IDO (284). Ces Treg inhibent également l'inflammation dans un modèle auto-immun d'uvéa-rétinite. Les Treg CD8<sup>+</sup>CD11c<sup>+</sup> activés expriment CD103, CD122 et les molécules effectrices Fas, perforine et granzyme B (285). Récemment Vinay *et al.* ont démontré que ces cellules peuvent inhiber l'inflammation intestinale dans un modèle de colite expérimentale induite par des haptènes (286).

### Les Treg CD8<sup>+</sup> HLA-G<sup>+</sup>

La molécule HLA non-classique HLA-G possède une capacité immunosuppressive. En effet, elle est capable d'inhiber la prolifération des LT CD4<sup>+</sup> allospécifiques ainsi que l'activation des cellules NK et des LT CD8<sup>+</sup> cytotoxiques (287-289). Feger *et al.* ont identifié chez l'Homme une sous-population de LT CD8<sup>+</sup> exprimant HLA-G et ayant une capacité

régulatrice. Les LT CD8<sup>+</sup> HLA-G<sup>+</sup> n'expriment pas Foxp3 et *in vitro* inhibent la prolifération des LT CD4<sup>+</sup> et CD8<sup>+</sup> en sécrétant HLA-G et du TFG-β (290). Ces cellules, qui représentent environ 3% des CD8<sup>+</sup> circulants chez des individus sains, sont retrouvées en plus grande proportion chez des patients souffrant de sclérose en plaque (SEP) et également dans les biopsies musculaires de patients souffrant de myopathies (290). L'ensemble de ces données suggère que l'expansion de la population de CD8<sup>+</sup> HLA-G<sup>+</sup> se fait en fonction du degré de régulation nécessaire au contrôle des réponses inflammatoires.

### Les Treg CD8<sup>+</sup>CD45RO<sup>+</sup>

Une sous-population de LT CD8<sup>+</sup> possédant des caractéristiques de cellules mémoires (CD28<sup>+</sup>CD45RO<sup>+</sup>CCR7<sup>+</sup>) et régulatrices (expression de CTLA-4 intracellulaire) a été identifiée chez les patients ayant subi une transplantation rénale. Ces cellules sont capables d'inhiber les réponses d'hypersensibilité retardée par un mécanisme dépendant de l'IL-10, TFG-β et CTLA-4 (291). Des Treg CD8<sup>+</sup>CD45RO<sup>+</sup> sont également retrouvés parmi les cellules infiltrant les tumeurs ovariennes. Ces cellules produisent de l'IL-10 et sont capables d'inhiber *in vitro* la prolifération de LT CD4<sup>+</sup> spécifiques d'antigènes issus de la tumeur (292).

### Les Treg CD8<sup>+</sup>CD45RC<sup>low</sup>

Chez le rat, Xystrakis *et al.* ont identifié des LT CD8<sup>+</sup>CD45RC<sup>low</sup> exprimant Foxp3<sup>+</sup>, CTLA-4 et produisant de l'IFN-γ, l'IL-4, l'IL-10 et l'IL-13. *In vitro*, ces derniers inhibent la prolifération et la production d'IFN-γ des Tconv (293).

Guillot *et al.* ont démontré que l'administration de la molécule CD40-Ig (protéine de fusion entre le CD40 et les domaines constants de l'IgG1 humain) protège contre le rejet d'allogreffe dans un modèle de transplantation de cœur chez le rat (294). Ce traitement va en fait induire des Treg CD8<sup>+</sup>CD45RC<sup>low</sup> qui jouent un rôle crucial dans l'inhibition du rejet de greffe. L'induction de cette population régulatrice se fait principalement par les DC plasmacytoïdes (295). L'IFN-γ produit par ces Treg vont induire l'expression d'IDO, par les cellules endothéliales du greffon et des cellules dendritiques, qui est cruciale à la survie de la greffe. De façon importante, cette tolérance aux allogreffes peut être transmise à un second donneur par transfert adoptif de Treg CD8<sup>+</sup>CD45RC<sup>low</sup> (296). Plus récemment, Picarda *et al.* ont démontré que ces Treg peuvent reconnaître un allo-peptide dérivé de la molécule de CMH-II du donneur. Les Treg CD8<sup>+</sup>CD45RC<sup>low</sup> spécifiques pour ce peptide présentent une capacité immunosuppressive *ex vivo* et sont capables d'induire une tolérance aux allogreffes lors de transfert adoptifs. (297).



### Les Treg CD8 $\alpha\alpha$ <sup>+</sup> intestinaux

Poussier *et al.* ont démontré que les LT CD8 $\alpha\alpha$ <sup>+</sup> intestinaux sont capables d'inhiber la pathologie dans un modèle de colite expérimentale. La protection par ces Treg est dépendante de la production d'IL-10 (298). Ces cellules, qui sont présentes chez des souris athymiques, se développent au niveau de l'intestin et expriment un répertoire du TCR oligoclonal (299).

### Les Treg CD8<sup>+</sup>CD28<sup>neg</sup>

L'équipe de Suci-Foca a mis en évidence une population de LT CD8<sup>+</sup> n'exprimant pas la molécule de co-stimulation CD28 et possédant une capacité immunosuppressive *in vitro* chez l'Homme. En effet, après plusieurs cycles de stimulation des cellules mononucléées du sang périphérique (PBMC) avec des CPA allogéniques, la prolifération dans ces cultures diminue. La déplétion en LT CD8<sup>+</sup> restaure la prolifération suggérant que des Treg CD8<sup>+</sup> ont été générés dans ces cultures après plusieurs cycles de stimulation allogénique. Par suite, il a été démontré que cette capacité immunosuppressive est restreinte aux LT CD8<sup>+</sup>CD28<sup>-</sup> (300). Tout comme les Treg CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>, les Treg CD8<sup>+</sup>CD28<sup>neg</sup> expriment GITR, CD25, CD103, CD62L et 4-1BB (301). Les Treg CD8<sup>+</sup>CD28<sup>-</sup> sont restreints par le CMH I et leur effet suppressive requiert une interaction avec des CPA. Chang *et al.* ont démontré que des LT CD8<sup>+</sup>CD28<sup>neg</sup> provenant de patients ayant accepté une greffe de foie (et pas ceux ayant rejeté la greffe), sont capables d'induire l'expression de l'ILT3 (Immunoglobuline-like transcript) et l'ILT4 par les cellules dendritiques rendant ces dernières tolérogènes (302). Par la suite, Kim-Schulze *et al.* ont démontré que l'ILT3 recombinante peut induire des Treg CD4<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> dans des cultures de PBMC humains (303). Des LT CD8<sup>+</sup>CD28<sup>neg</sup> avec une capacité régulatrice sont également retrouvés parmi les cellules infiltrant des tumeurs (304) et chez des patients souffrant de maladies auto-immunes tel que la myasthénie grave, le diabète de type I et la sclérose en plaque (305, 306).

Une population homologue a été identifiée chez la souris. Najafian *et al.* ont démontré que les souris déficientes pour CD28 sont résistantes à l'induction de l'EAE. Ils ont démontré par la suite que c'est la population de LT CD8<sup>+</sup> qui est responsable de cette protection chez ces souris. Les Treg CD8<sup>+</sup>CD28<sup>neg</sup> sont capables d'inhiber *in vitro* et *in vivo* l'activation de LT CD4<sup>+</sup> spécifique de MOG (myelin oligodendrocyte glycoprotein) (307). Tout comme chez l'Homme, l'immunosuppression par les Treg CD8<sup>+</sup>CD28<sup>-</sup> nécessite une interaction avec des CPA. Ceci conduit à la diminution de l'expression de CD80, CD86 et CD40 sur les CPA. Ben-David *et al.* ont récemment démontré que des Tregs CD8<sup>+</sup>CD28<sup>neg</sup>Foxp3<sup>+</sup> producteurs

d'IL-10 et TGF- $\beta$  préviennent la pathologie dans un modèle murin de myasthénie grave (308).

### Les Treg CD8<sup>+</sup>CD28<sup>low</sup> murins

Notre équipe a démontré qu'une population de LT CD8<sup>+</sup> exprimant de faibles niveaux de CD28 peut inhiber l'inflammation intestinale. Dans le modèle murin de colite le plus caractérisé, des lymphocytes T naïfs CD4<sup>+</sup> CD45RB<sup>high</sup> sont injectés à des animaux immunodéficients (rats athymiques, souris SCID, ou souris déficientes pour RAG1 ou RAG2). Ces souris développent progressivement des signes cliniques d'une colite : perte de poids, diarrhée, stature prostrée et poil hirsute. Une co-injection de Treg CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> avec les cellules T colitogènes CD4<sup>+</sup> CD45RB<sup>high</sup> prévient le développement de la colite (309). Notre équipe a démontré que les lymphocytes T CD8<sup>+</sup>CD28<sup>low</sup> spléniques ou isolés de l'intestin préviennent la colite expérimentale induite par l'injection de cellules colitogènes chez la souris déficiente pour RAG2. Les Treg CD8<sup>+</sup>CD28<sup>low</sup> déficientes pour l'IL-10 ne protègent pas contre le développement de la colite dans ce modèle. Afin d'étudier le rôle du TGF- $\beta$ , des cellules colitogènes transgéniques pour une forme dominante-négative du récepteur de type II au TGF- $\beta$  ont été isolées. Ces cellules, ne pouvant pas répondre au TGF- $\beta$ , ont ensuite été injectées à des souris déficientes pour RAG2. Ces souris développent une colite et la co-injection de Treg CD8<sup>+</sup>CD28<sup>low</sup> ne les protège pas contre la pathologie. Ces résultats montrent le rôle non-redondant de l'IL-10 et du TGF- $\beta$  dans la prévention de la colite par les Treg CD8<sup>+</sup>CD28<sup>low</sup> dans notre modèle (310). Les Treg CD8<sup>+</sup>CD28<sup>low</sup> peuvent également prévenir l'EAE (307). Les Treg CD8<sup>+</sup>CD28<sup>low</sup>, qui représentent environ 25% des LT CD8<sup>+</sup>, n'expriment ni CD25 ni CD122 et sont retrouvés dans un état naïf quiescent chez la souris non-manipulée (310).

Les Treg CD8<sup>+</sup>CD28<sup>low</sup> murins sont distincts des Treg CD8<sup>+</sup>CD28<sup>-</sup> identifiés chez l'Homme. En effet, les Treg CD8<sup>+</sup>CD28<sup>-</sup> humains qui ont un phénotype de cellules activées (CD45RO<sup>+</sup>) expriment Foxp3 et ne produisent pas les médiateurs immunosuppresseurs, IL-10 et TGF- $\beta$  (302, 311). A ce jour, l'origine des Treg CD8<sup>+</sup>CD28<sup>low</sup> murins ainsi que les facteurs impliqués dans son développement ne sont pas connus. De plus, aucune population homologue n'a été décrite chez l'Homme.

Tableau récapitulatif des populations de Treg CD8<sup>+</sup> chez la souris

Phénotype	Mécanismes	Fonctions	Réf
CD8 <sup>+</sup> CD122 <sup>high</sup>	IL-10	Inhibition EAE, colite, myasténie grave, rejet allogreffes, immunopathologie	255-259
CD8 <sup>+</sup> restreints à Qa-1	perforine, IFN- $\gamma$	Inhibition EAE, diabetes de type 1, kératite induite par HSV, lupus	124, 261-269
CD8 <sup>+</sup> CD103 <sup>+</sup>	IL-10, TGF- $\beta$	Inhibition rejet d'allogreffe, colite	275-276
CD8 <sup>+</sup> CD25 <sup>+</sup> Foxp3 <sup>+</sup>		Inhibition inflammation intestinale, Inhibition prolifération des Tconv	283
CD8 <sup>+</sup> CD11c <sup>+</sup>	IFN- $\gamma$ , IDO	Inhibition AIC, uvéorétinite, colite	284-286
CD8 <sup>+</sup> CD45RC <sup>low</sup> (rat)	IFN- $\gamma$ , IDO	Inhibition de rejet d'allogreffe	294-297
CD8 $\alpha\alpha$ <sup>+</sup> intestinaux	IL-10	Inhibition colite	298
CD8 <sup>+</sup> CD28 <sup>low</sup>	IL-10, TGF- $\beta$	Inhibition EAE, colite, myasténie grave,	309-310

Tableau récapitulatif des populations de Treg CD8<sup>+</sup> chez l'Homme

Phénotype	Mécanismes	Fonctions	Réf
CD8 <sup>+</sup> CXCR3 <sup>+</sup>	IL-10	Inhibition de la prolifération de Tconv	260
LT CD8 <sup>+</sup> restreint au HLA-E (de patients SEP et TD1)	perforine, IFN- $\gamma$	Inhibition de la prolifération de Tconv	270,271
CD8 <sup>+</sup> CD103 <sup>+</sup>	IL-10, TGF- $\beta$	Inhibition de la prolifération de Tconv	274
CD8 <sup>+</sup> CD45RO <sup>+</sup> (de patients greffés)	IL-10, TGF- $\beta$ , CTLA4	Inhibition de la prolifération de Tconv, réponses d'hypersensibilités retardées	292

## 4. Les autres populations de lymphocytes régulateurs

### Les Tr1

Les Tr1 ont été mis en évidence pour la première fois chez des patients souffrant d'immunodéficience combinée sévère (SCID) ayant reçu une transplantation de moelle osseuse. Malgré des incompatibilités entre donneur et receveur, les patients ne développaient pas de maladie du greffon contre l'hôte, même en absence de traitement avec des immunosuppresseurs mais présentaient des niveaux élevés d'IL-10 dans le sang. On a rapidement mis en évidence que c'était une sous-population de LT CD4<sup>+</sup> provenant du receveur qui était la source de cette cytokine (153). Chez les sujets non-asthmatiques, la majorité des LT CD4<sup>+</sup> allergène-spécifiques sont des Tr1 alors que chez des patients asthmatiques ces cellules sont majoritairement des cellules productrices d'IL-4 (312). Tout comme les Treg CD4<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>, les Tr1 sont anergiques et il semblerait qu'*in vitro* cet état est dû en partie à l'action autocrine de l'IL-10 (153). *In vivo*, cet état anergie est contrecarré par l'action de l'IL-15 permettant ainsi la prolifération des Tr1 (313).

Groux *et al.* ont démontré qu'une stimulation antigénique répétitive en présence d'IL-10 induit la conversion des LT naïfs en Tr1 (314). Les Tr1 migrent préférentiellement vers les sites inflammatoires et sont capables de prévenir l'inflammation au niveau du côlon et du système nerveux central chez la souris (314, 315). *In vivo*, l'injection de rapamycine et d'IL-10 induit des Tr1 qui induisent une tolérance à long terme à une allogreffe du pancréas (316).

Auparavant, les Tr1 étaient définis par le phénotype Foxp3<sup>+</sup>IL10<sup>+</sup>IL5<sup>+</sup>IL4<sup>+</sup>IL2<sup>-/+</sup>IFN $\gamma$ <sup>+</sup> (153, 314, 317). D'autres équipes ont démontré que les Tr1 peuvent également exprimer ICOS (318), PD-1 (312) et CD226 (319). Cependant, l'ensemble des marqueurs mentionnés ci-dessus n'est pas spécifique aux Tr1. Plus récemment, Gagliani *et al.* ont démontré que l'expression combinée de LAG-3 (un homologue du co-récepteur CD4 se liant au CMH-II) et CD49b (intégrine  $\alpha$ 2) permet d'identifier spécifiquement les Tr1 aussi bien chez la souris que chez l'Homme (320).

### Les iNKT

Les iNKT sont définis comme un lignage de LT exprimant des marqueurs des cellules NK et un TCR $\alpha\beta$  semi-invariant restreint par le CMH non-classique CD1d. Plus de 80% des TCR des iNKT sont Va14-J $\alpha$ 18 chez la souris et Va24-J $\alpha$ 18 chez l'Homme. Ces cellules reconnaissent des lipides d'origine endogène et exogène présentés par le CD1d (321). Des défauts dans la fonction des iNKT ont été mis en évidence chez la souris Non-Obese Diabetic (NOD) qui développe spontanément un diabète auto-immun. De plus, l'injection d' $\alpha$ -

galactosylcéramide ( $\alpha$ -Gal-Cer), un ligand activateur du TCR des iNKT provenant d'une éponge marine, prévient le survenu de la maladie chez les souris NOD. Ces cellules peuvent également prévenir l'inflammation dans des modèles murins d'EAE et de colite expérimentale (322). Les travaux de Terabe *et al.* suggèrent également un rôle des iNKT dans l'inhibition de la réponse anti-tumorale (323).

### Les LT $\gamma\delta$

Les LT $\gamma\delta$  sont localisés préférentiellement au niveau de l'épithélium tissulaire (poumons, intestin, peau et tractus génital) (324). Contrairement aux LT $\alpha\beta$ , les LT $\gamma\delta$  n'interagissent pas avec les molécules de CMH I et II classiques. Au niveau de l'épithélium, ces cellules sont capables de reconnaître directement des molécules, notamment ceux de stress, et répondre rapidement à des infections. De façon étonnante, les souris déficientes en TCR $\gamma\delta$  développent des réponses immunitaires exagérées ou accélérées lors d'infections suggérant un rôle des LT $\gamma\delta$  dans l'immunorégulation (325). Les souris déficientes en LT $\gamma\delta$  développent une inflammation intestinale plus sévère que les souris sauvages dans un modèle de colite induite chimiquement par l'injection de dextrane sulfate de sodium (DSS) (326). Ces souris sont également plus susceptibles au développement du lupus (327). Une déficience en LT $\gamma\delta$  chez la souris NOD conduit à une inflammation spontanée au niveau de l'épiderme (324). Peng *et al.* ont eux démontré que des clones de LT $\gamma\delta$  isolés de cancers du sein ou de prostate inhibent *in vitro* l'activation des LT CD4<sup>+</sup> et la maturation des DC (328). Les mécanismes de régulation par les LT $\gamma\delta$  comprennent la sécrétion de molécules immuno-modulatrices telles que l'IL-10 (329) et le TGF- $\beta$  (254), la cytolysse des DC ou des Tconv (330, 331). Les LT  $\gamma\delta$  pourrait également limiter le recrutement d'autres cellules immunitaires sur le site inflammatoire en agissant sur la perméabilité de la barrière épithéliale (324).

### Les lymphocytes B régulateurs (Breg)

Fillatreau *et al.* ont démontré que les souris où uniquement les lymphocytes B ne produisent pas d'IL-10 sont plus susceptibles à l'EAE que les souris sauvages (332). Cette étude fût parmi les premières à mettre en avant un rôle immuno-modulateur des lymphocytes B. Depuis, le rôle régulateur des Breg a été mis en évidence dans différents modèles d'infections et de maladies auto-immunes. Des Breg ont également été identifiés chez l'Homme où ils représentent moins de 3% des lymphocytes B circulants, mais leur proportion augmente en conditions inflammatoires. L'induction de ces cellules nécessite une stimulation antigénique, la présence d'IL-21 et une interaction avec le CD40 exprimé par les T CD4<sup>+</sup> (333). Récemment, Wang *et al.* ont démontré que l'IL-35 peut aussi induire des Breg qui sont

capables de prévenir l'uvéite chez la souris (334). La stimulation de lymphocytes B humains avec de l'IL-35 induit également la production d'IL-10.

### Les cellules dendritiques tolérogènes (Tol-DC)

Les DC sont les cellules présentatrices d'antigène les plus efficaces du système immunitaire. Mise à part leur capacité à induire et moduler les réponses adaptatives, ces cellules participent également à la tolérance périphérique. En effet, Ohnmacht et al. ont démontré que l'ablation constitutive de DC chez la souris conduit à la rupture de la tolérance au soi de LT CD4<sup>+</sup> et le développement spontané de pathologies auto-immunes fatales soulignant l'importance de ces cellules dans le maintien de l'homéostasie immunitaire (335).

Les DC tolérogènes ou Tol-DC sont capables d'induire la délétion ou l'anergie de lymphocytes T et de produire des molécules immuno-modulatrices (IL-10 et TGF- $\beta$ ) ou immunosuppressives (IDO). Les Tol-DC peuvent également induire des lymphocytes T régulateurs. L'acquisition de ce phénotype tolérogène dépend de l'état de maturation des DC, leur exposition à des molécules anti-inflammatoires et/ou immuno-modulatrices, la nature de la stimulation pathogénique et des signaux du microenvironnement tissulaire. L'ensemble de ces signaux est perçu par une variété de récepteurs tels que les TLR (TLR-2,6,9), les récepteurs aux lectines de type-C (DC-SIGN, DNGR-1) les lectines de type S (Galectine), les récepteurs Fc et les Immunoglobulin-like transcripts (ILT3 et ILT4) (336, 337).

### Les myeloid-derived suppressor cells (MDSC)

Les MDSC sont une population hétérogène de cellules progénitrices et de macrophages, granulocytes, et cellules dendritiques immatures qui ont été associées avec plusieurs fonctions immunosuppressives. Ces cellules s'accumulent dans le sang, les organes lymphoïdes secondaires et la rate suite à des perturbations immunologiques telles que les infections, les greffes de moelle osseuse et certaines maladies auto-immunes (338, 339). Une forte proportion de ces cellules est retrouvée également dans les tumeurs. En effet, dans plusieurs modèles de cancer chez la souris, les MDSC représentent entre 20-40% des splénocytes totaux contre 2-4% chez des souris sauvages (340). Plusieurs sous-populations de MDSC ont été décrites aussi bien chez l'Homme que chez la souris. Malgré leur hétérogénéité, la plupart de MDSC exprime GR1 et CD11b chez la souris et CD11b, CD33, CD34 et le CMH II chez l'Homme (338).

*In vitro*, Les MDSC inhibent la prolifération et la production de cytokines par les LT, les LB et les NK via des mécanismes dépendant d'arginase 1 et de NOS2. Elles peuvent également influencer les voies de différenciation de LT en favorisant l'induction de Treg via

un mécanisme dépendent de l'IL-10 et du IFN $\gamma$  (341). De façon importante, l'interaction entre les MDSC et les macrophages va conduire à la différenciation de ces derniers en macrophages alternatifs. Dans des modèles de transplantation de cœur et d'ilots, les MDSC sont capable d'induire une tolérance aux alloantigènes (342-344).

### Les macrophages régulateurs

Les macrophages peuvent aussi bien avoir des rôles protecteurs que pathologiques dans l'organisme. (345). Ainsi, alors que les macrophages classiques contribuent à la destruction tissulaire lors de transplantation d'organes, les macrophages régulateurs vont eux vont inhiber la production de cytokines pro-inflammatoires par ces macrophages classiques contribuant ainsi à la cicatrisation et la réparation tissulaire (346). Le rôle physiologique des macrophages régulateurs serait donc de diminuer les réponses inflammatoires. Ces cellules produisent de l'IL-10 et sont capables d'inhiber la prolifération des lymphocytes T *in vitro* (338).

Dans une étude clinique, l'administration de macrophages régulateurs de phénotype CD14<sup>-/low</sup>CD16<sup>-</sup>CD64<sup>+</sup>CD80<sup>-/low</sup>CD86<sup>+</sup>CD163<sup>-/low</sup> HLA-DR<sup>+</sup>TLR2<sup>-</sup>, à des patients ayant subi une transplantation de rein, diminue leur besoin en drogues immunosuppressives (347). Les macrophages régulateurs de l'hôte ont également un rôle protecteur lors de la transplantation (348).



### *III-Rôle de Aire dans l'induction de tolérance*

#### *Introduction*

Le clonage du locus lié au syndrome auto-immun Autoimmune-Polyendocrinopathy-Candidiasis-Ectodermal Dystrophy (APECED)(349, 350) a permis de mettre en évidence le gène Autoimmune Regulator, AIRE. Ce syndrome se déclenche lors de l'enfance avec une candidose chronique avec ou sans production d'auto-anticorps dirigés contre l'IL-17 et l'IL-22 (351). Les symptômes vont graduellement s'empirer avec une production d'anticorps dirigés contre plusieurs antigènes du soi, l'infiltration lymphocytaires des glandes endocrines et finalement des dysfonctionnements du système endocrine (352, 353). La maladie est à transmission autosomique récessive et est due à une perte de fonction de AIRE. Les souris déficientes pour AIRE présentent des symptômes (auto-anticorps et infiltrations lymphocytaires) ressemblant à ceux des patients APECED même si le syndrome murin est moins sévère (354).

Au niveau de l'organisme, Aire est principalement exprimé par l'épithélium médullaire thymique, plus précisément par une population de mTEC exprimant fortement le CMH II et CD80. Au niveau des ces mTEC CMH II<sup>high</sup> CD80<sup>high</sup> (355), Aire est localisé dans le noyau sous forme de structures pointillées ressemblant aux corps nucléaires promyelocytic leukemia (PML) (356, 357). Les corps PML sont associés à plusieurs activités incluant la modulation de la structure chromatinienne, la transcription génique et la réparation de l'ADN (358).

#### *1. Aire et l'expression de TSA*

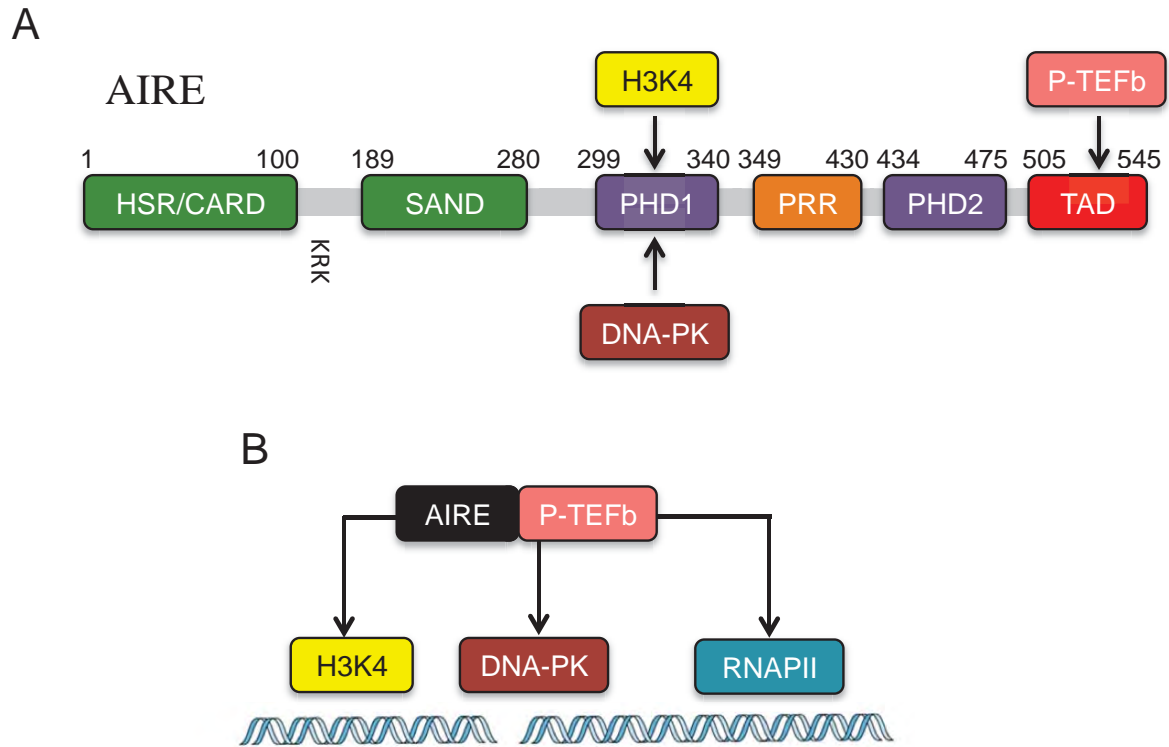
La comparaison du transcriptome entre les mTEC de souris sauvages et celles de souris déficientes pour AIRE a mis en évidence des cibles potentielles pour AIRE sur l'ensemble du génome (359). Le fait que ces cibles soient organisées en cluster suggérait que AIRE favorisait vraisemblablement l'ouverture de la chromatine permettant ainsi l'expression de gènes jusqu'alors réprimés. Or, les milliers de TSA sous contrôle de AIRE ont des promoteurs différents et sont régulés par différents facteurs de transcription dans leur tissus correspondants (355, 359). Le mécanisme par lequel AIRE peut induire l'expression d'un nombre important de gènes divergents restait énigmatique. L'étude des différents domaines présents au niveau de la protéine AIRE a énormément contribué à la compréhension de ce mécanisme.

La séquence NLS (nuclear localization sequence) de AIRE se trouve dans la partie N-terminale (360). En C-terminale, on retrouve deux domaines PHD (plant homeodomain),

PHD 1 et PHD 2 et un domaine TAD (transcriptional activation domain) (361, 362). Le domaine PHD1 permet à AIRE de se lier à la partie N-terminale de l'histone H3 sous sa forme non-modifiée (H3K4). Cette interaction AIRE-PHD1/H3K4 est nécessaire pour l'activation de la transcription des gènes (363-365). PHD1 se lie également à DNA-PK (DNA-dependent kinase) qui est impliqué dans la réparation de l'ADN, le remodelage de la chromatine et la transcription génique. Le domaine PHD2 n'interagit pas avec les nucléosomes mais participe sur le plan structurel à l'activation des gènes (363, 366, 367).

Le domaine TAD d'AIRE quant à lui permet le recrutement de positive transcription elongation factor b (P-TEFb). Lors de la transcription, les facteurs de transcription et l'ARN polymérase II (RNAPII) sont recrutés au niveau des promoteurs (368). Bien que la RNAPII va initier la transcription, cette dernière va s'interrompre sous l'effet inhibitrice de negative elongation factor (NELF) et de 6-dichloro-1-a-D-ribofuranosylbenzimidazole sensitivity inducing factor (DSIF). La phosphorylation de RNAPII par P-TEFb permet ensuite la reprise de la transcription (369, 370). De façon intéressante, la forme non-phosphorylée de RNAPII est retrouvée au niveau de la majorité des promoteurs y compris ceux des gènes inactifs (371-373).

L'un des caractéristiques des gènes sous contrôle d'AIRE est qu'ils ont engagé la RNAPII sur leur promoteur même s'ils ne sont pas actifs (368, 374). Ceci signifie que la machinerie basale de transcription est déjà en place mais que la RNAPII n'étant pas phosphorylée, il y a peu ou pas de génération de transcrits stables (375). En l'absence de la forme phosphorylée de RNAPII, il n'y pas d'assemblage de la machinerie permettant de modifier la chromatine et donc H3K4 reste sous sa forme non-modifiée. Ceci conduit au recrutement de AIRE *via* son domaine PHD1 au niveau de ces gènes inactifs (364, 365). Ce même domaine va permettre le recrutement de la DNA-PK dont interaction avec RNAPII a été associée avec l'initiation de la transcription. P-TEFb qui lui est associé au domaine TAD de AIRE va phosphoryler RNAPII et conduire à la transcription du gène. L'interaction combinée de AIRE, H3K4, DNA-PK, P-TEFb et RNAPII permet ainsi l'expression des gènes TSA normalement réprimés dans d'autres tissus.



**FIGURE 10: Les domaines protéiques de AIRE, ses partenaires clés et le mécanisme d'induction de l'expression de TSA.**

(A) AIRE contient plusieurs domaines présentant des homologies avec ceux d'autres facteurs de transcription. De la partie N-term: HSR (vert) qui est important pour l'oligomérisation de AIRE; KRR qui correspond à la séquence NLS; SAND (vert) qui est impliqué dans l'oligomérisation et se lie également à l'ADN; PHD1 et PHD2 (violet) qui interagissent avec la DNA-PK (marron) ou participent sur le plan structural à l'activation des gènes respectivement ; région riche en proline (PPR, orange); et TAD qui va recruter le facteur d'élongation TEFb (rose) . Les résidus de la protéine humaine sont indiqués en haut. (B) Schéma montrant le mécanisme moléculaire par lequel AIRE régule l'expression des TSA. L'action combinée entre AIRE, H3K4 non-modifié (jaune), la DNA-PK (marron) et la RNAPII (bleu) permet le recrutement de AIRE au niveau du promoteur du TSA. AIRE recrute par la suite TEFb (rose) qui va phosphoryler la RNAPII (RNA polymérase II) et induire l'élongation du transcrit, la génération de l'ARNm et l'expression du TSA.

## 2. Fonctions de AIRE dans la tolérance centrale

### a. Rôle de AIRE dans la sélection négative

Afin d'évaluer le rôle de AIRE dans la tolérance centrale, Liston *et al.* ont généré des souris exprimant la protéine HEL (Hen egg lysozyme) sous contrôle du promoteur de l'insuline. Chez ces souris, HEL est donc exprimé par les cellules  $\beta$  du pancréas mais également par les mTECs. Au niveau du thymus, l'expression de HEL est sous contrôle de AIRE. Le croisement de ces souris avec une lignée où les LT expriment un TCR transgénique spécifique pour HEL conduit à une forte délétion de ces LT au niveau du thymus. Cependant, lorsque ces souris double-transgéniques sont sous fond AIRE<sup>-/-</sup>, il n'y a quasiment plus de sélection négative des LT spécifiques de HEL (376). Des résultats similaires ont été obtenus en utilisant l'ovalbumine comme neo-antigène du soi (377). Ainsi, l'expression d'antigènes

induite par AIRE au niveau du thymus, permet l'élimination de LT spécifiques de cet antigène. Depuis, plusieurs études ont mis en évidence le lien entre l'absence de l'expression de TSA sous contrôle AIRE dans le thymus et les phénomènes auto-immuns touchant les organes exprimant ces TSA en périphérie notamment l'œil (378), la prostate (379) et les poumons (380).

Parmi les TSA sous contrôle de AIRE, on retrouve IRBP qui est la cible d'une pathologie auto-immune spécifique de l'œil chez les souris déficientes pour AIRE. La transplantation de thymii issus de souris déficiente pour IRBP chez des souris athymiques exprimant IRBP est suffisante pour induire une pathologie auto-immune au niveau de l'œil. Par conséquent, l'absence de l'expression d'un seul TSA au niveau du thymus est suffisante pour conduire à une pathologie auto-immune soulignant l'importance de son expression ectopique dans la sélection négative (378).

Les cellules dendritiques étant eux-aussi impliquées dans la sélection des lymphocytes T au niveau de la médulla, plusieurs études ont évalué l'expression potentielle de Aire au niveau des DC. Plusieurs équipes ont effectivement pu mettre en évidence une expression d'ARNm de Aire au niveau de ces cellules (381). Cependant, l'expression de la protéine Aire par ces cellules reste à ce jour controversée. En effet, L'étude de Hubert *et al.* utilisant un nouveau anticorps anti-Aire n'a pu mettre en évidence la protéine au niveau des différents sous-populations de DC (382). Il semblerait donc que Aire ne joue pas de rôle intrinsèque au niveau de DC.

Mise à part son rôle dans l'induction de l'expression de TSA, plusieurs études suggèrent d'autres fonctions de Aire dans la tolérance centrale. En effet, les souris déficientes pour Aire développent des réponses auto-immunes contre dirigés contre des TSA qui ne sont pas sous contrôle de AIRE. Parmi ces TSA indépendants de AIRE, on retrouve notamment l' $\alpha$ -fodrine et l'isomerase A2. L'absence de tolérance envers des antigènes du soi chez les souris AIRE<sup>-/-</sup> conduit à des atteintes auto-immunes au niveau des glandes salivaires et du pancréas respectivement (383, 384).

#### **b. AIRE et la migration des thymocytes et des cellules dendritiques**

La sélection négative de thymocytes en développement nécessite la migration de ces cellules du cortex vers la médulla pour y interagir avec les mTEC et les DC. L'expression de CCR7 est nécessaire à la migration du cortex vers la médulla (123). Les souris déficientes en CCR7 présentent effectivement des défauts dans la tolérance centrale et par conséquent des phénomènes auto-immuns caractérisés par la production d'auto-anticorps et des infiltrats au niveau des organes en périphérie (97, 385). Ces symptômes ressemblent ceux observés chez

les souris déficientes pour AIRE. Il a en effet été démontré que, sous contrôle de ce facteur de transcription les mTEC produisent des quantités importantes de CCL19 et CCL21, les ligands de CCR7. Un retard dans la migration cortico-médullaire des thymocytes est ainsi observé au chez les souris AIRE<sup>-/-</sup> (386).

En plus de son rôle dans la migration des thymocytes, Aire est également impliqué dans la migration des DC. Les DC thymiques expriment le récepteur au chimiokine XCL1. Lei et al ont démontré que l'expression de XCL1 par les mTEC est sous le contrôle de Aire et qu'en son absence, les DC se localisent incorrectement au niveau de la jonction cortico-médullaire et ne pénètrent pas dans la médulla où le transfert de TSA des mTEC aux DC se fait vraisemblablement (387).

### c. Aire et la maturation des mTEC

Gray *et al.* ont observé que les mTEC AIRE<sup>+</sup> ont un turnover élevé c-à-d que ces cellules meurent rapidement par apoptose. Ils démontrent également que c'est l'expression de AIRE qui induit la mort accélérée des cellules. Ainsi, en augmentant l'apoptose de mTEC, AIRE favoriserait le transfert de TSA aux DC pour la cross-présentation et de ce fait la sélection négative des LT auto-spécifiques (388).

Les travaux de Gillard *et al.* et de Dooley *et al.* ont démontré qu'une déficience en AIRE altère la maturation et la morphologie des mTEC (389, 390). Ceci va non-seulement impacter l'expression des TSA sous contrôle de AIRE mais également celle des autres TSA notamment les kératines. De façon intéressante, Wada *et al.* ont récemment démontré que chez les souris déficientes pour AIRE il y a un défaut de tolérance envers une de ces kératines, la desmoglérine-3. Ceci démontre qu'à travers son implication dans la maturation des mTEC, Aire contribue également à la sélection négative de TSA qui ne sont pas directement sous son contrôle (391).

### d. Aire et le développement de nTreg

Aschenbrenner *et al.* ont démontré que l'expression d'antigènes du soi par les mTEC est impliquée dans la différenciation de Treg Foxp3<sup>+</sup> (392). En vue du caractère auto-immun de la pathologie se développant chez les souris déficientes pour AIRE, plusieurs équipes se sont intéressées au rôle de ce facteur de transcription dans le développement thymique des Treg Foxp3<sup>+</sup>.

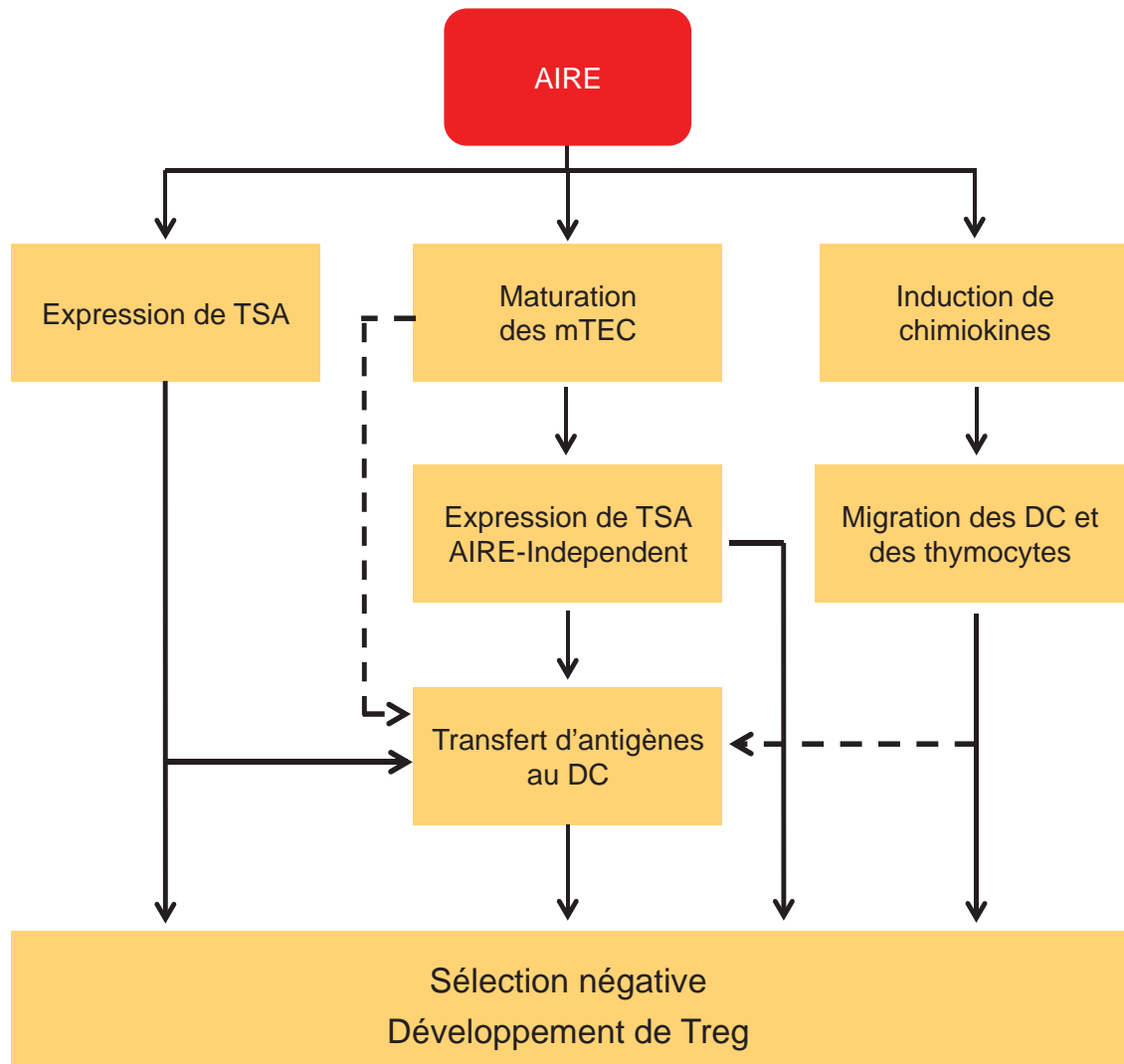
Les souris AIRE<sup>-/-</sup> ne présentent pas d'altération dans le nombre de Treg CD4<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> au niveau du thymus et en périphérie. *In vitro* les Treg issus de ces souris ont une capacité immunosuppressive similaire à celle de leur homologues issus de souris sauvages (376, 377,

383). Pour évaluer le rôle de AIRE dans la tolérance dominante *in vivo*, Anderson *et al.* ont réalisé des greffes combinées de thymus issus de souris sauvages et AIRE<sup>-/-</sup> chez des souris athymiques (nude). Ainsi, si il y avait un défaut dans la génération de Treg au niveau du thymus AIRE<sup>-/-</sup>, ceci devait être compensé par les Treg générés dans le thymus wt. Or, les souris greffées présentaient quand même des atteintes auto-immunes (377). D'autres études ont comparé le répertoire TCR des Treg CD4<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> issus de souris sauvages et AIRE<sup>-/-</sup> et n'ont pas pu mettre en évidence des différences significatives entre ces deux populations (393). Chez les patients souffrant d'APECED, la fréquence et le nombre de Treg CD4<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> sont diminués. De plus, ces cellules expriment moins de Foxp3 que les cellules provenant de personnes saines et présentent des altérations de leur capacité immunosuppressive *in vitro*. Cependant, Foxp3 n'étant pas un marqueur spécifique des Treg chez l'Homme (voir plus haut), les conclusions de ces études restent controversées (394).

Ainsi, jusqu'à présent, aucune étude n'a pu mettre en évidence une implication significative de AIRE dans le développement de Treg Foxp3<sup>+</sup> ou d'autres populations de Tregs.

### 3. Rôle de Aire en périphérie

Gardner *et al.* ont démontré que Aire est également exprimé en périphérie au niveau de cellules stromales de la rate et des nœuds lymphatiques. Tout comme dans des mTEC, Aire se localise au niveau du noyau sous forme de PML dans ces cellules (395). La comparaison du transcriptome des cellules stromales issus de souris déficientes pour Aire et ceux issus de souris sauvages a mis en évidence une centaine de TSA sous contrôle de Aire dans ces cellules. De façon intéressante, les TSA sous contrôle de Aire en périphérie ne sont pas les mêmes que ceux dans le thymus (395). Ce nouveau panel de TSA en périphérie suggère que le rôle de Aire en périphérie complèterait celui de Aire dans le thymus. En effet, les cellules stromales Aire<sup>+</sup> peuvent induire la délétion des LT ayant reconnu des complexes CMH-peptides du soi au niveau de ces cellules (395). Récemment, Poliani *et al.* ont étudié l'expression de AIRE au cours de l'ontogénie. De façon intéressante, ils ont observé que les cellules périphériques AIRE<sup>+</sup> ne sont pas présentes chez le fœtus et qu'elles n'apparaissent qu'au début de l'âge adulte (396). Ces résultats suggèrent que l'expression périphérique de AIRE prendrait son importance chez les sujets vieillissants où l'acteur critique de l'induction de tolérance passe du thymus en involution à la périphérie.



**FIGURE 11:** Rôle de AIRE dans la tolérance centrale et périphérique

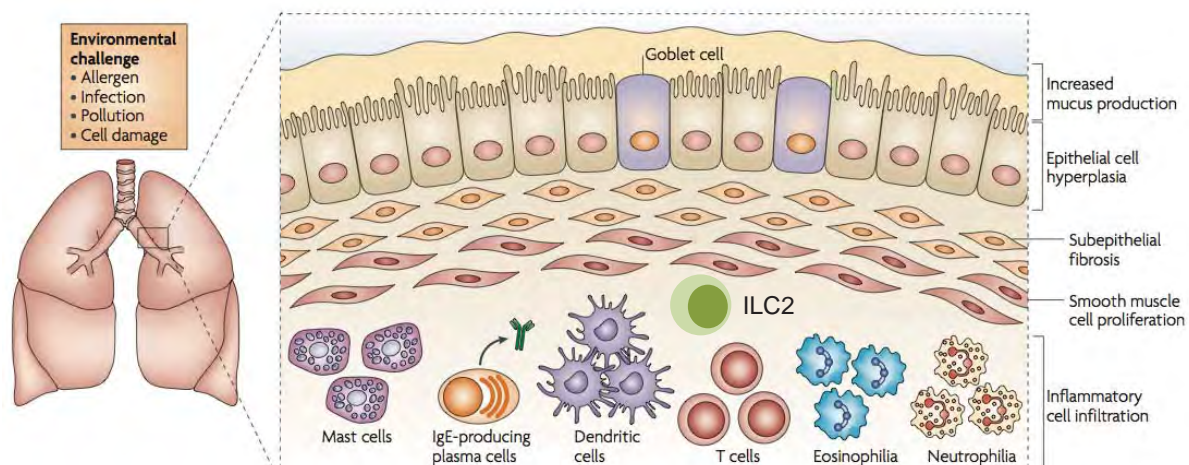
Le facteur de transcription AIRE induit l'expression de TSA au niveau du thymus et conduit à la sélection négative de lymphocytes T conventionnels auto-spécifiques. Les mTEC vont induire l'anergie de ces cellules alors que le transfert d'antigènes aux cellules dendritiques va permettre la délétion clonale. AIRE influence également la maturation des mTEC et leur survie permettant ainsi l'expression de TSA et autres antigènes qui ne dépendent pas de AIRE. AIRE contrôle également l'expression de chimiokines impliquées dans la migration de lymphocytes T et des cellules dendritiques au niveau de la médulla. Finalement, AIRE est impliqué dans la différenciation de lymphocytes T régulateurs CD4<sup>+</sup> et CD8<sup>+</sup>. L'implication de AIRE dans l'ensemble de ces mécanismes explique le syndrome auto-immun dont souffrent les patients et souris présentant de mutations dans AIRE.



#### *IV- L'asthme allergique*

L'asthme et l'inflammation allergique qui comprend également les allergies alimentaires, sont devenus en cinquante ans, la maladie chronique la plus représentée chez l'enfant dans les pays développés. Le nombre de personnes souffrant d'asthme est estimé à environ 300 millions dans le monde entier. L'asthme est caractérisé par une inflammation chronique des voies respiratoires avec des infiltrations massives en éosinophiles, mastocytes et lymphocytes T CD4<sup>+</sup> de type Th2. Ces cellules inflammatoires vont libérer différents médiateurs qui vont déclencher la constriction des bronches, la sécrétion de mucus et le remodelage tissulaire. Parmi ces médiateurs pro-inflammatoires, on retrouve des cytokines, des chimiokines, des facteurs de croissance, des médiateurs lipidiques, des immunoglobulines et l'histamine. Le contrôle de cette inflammation est souvent difficile à cause de l'acquisition d'une mémoire immunologique suite au déclenchement de la réponse adaptative. Ainsi, les réponses secondaires contre ces allergènes vont induire une inflammation persistante et des dommages importants au niveau des voies respiratoires.

L'asthme allergique était classiquement considéré comme une maladie impliquant principalement les lymphocytes T CD4<sup>+</sup> Th2. Ceci était dû à l'expression accrue de l'IL-4, l'IL-5 et l'IL-13, dont la production était attribuée au Th2, retrouvés chez les patients asthmatiques et qui vont induire l'inflammation pulmonaire. Cependant, les données récentes de la littérature démontrent que l'asthme allergique ne peut plus être considéré comme un dysfonctionnement de la réponse adaptative (CD4<sup>+</sup> Th2) uniquement mais plutôt comme une interaction entre la réponse innée et adaptative qui va influencer l'initiation et la propagation de la réponse inflammatoire pulmonaire. Ainsi, l'hétérogénéité des signes cliniques de l'asthme allergique pourrait s'expliquer par ces interactions complexes et variables entre différentes cellules immunitaires, stromales et épithéliales.



**FIGURE 12: Les différents acteurs de la réponse allergique**

L'asthme est une maladie hétérogène qui est caractérisée par une hyperréactivité bronchique, le recrutement de cellules inflammatoires au niveau des poumons, le remodelage tissulaire, la production de mucus et des atteintes des cellules musculaires lisses. Plusieurs populations cellulaires immunitaires et stromales sont impliquées dans l'initiation, la propagation et le maintien de l'inflammation. Plusieurs facteurs environnementaux tels que les allergènes et la pollution vont influencer la nature et l'intensité de la réponse allergique.

D'après Lloyd *et al.* (397)

## 1. Déclenchement de l'asthme allergique

### a. La sensibilisation à l'allergène

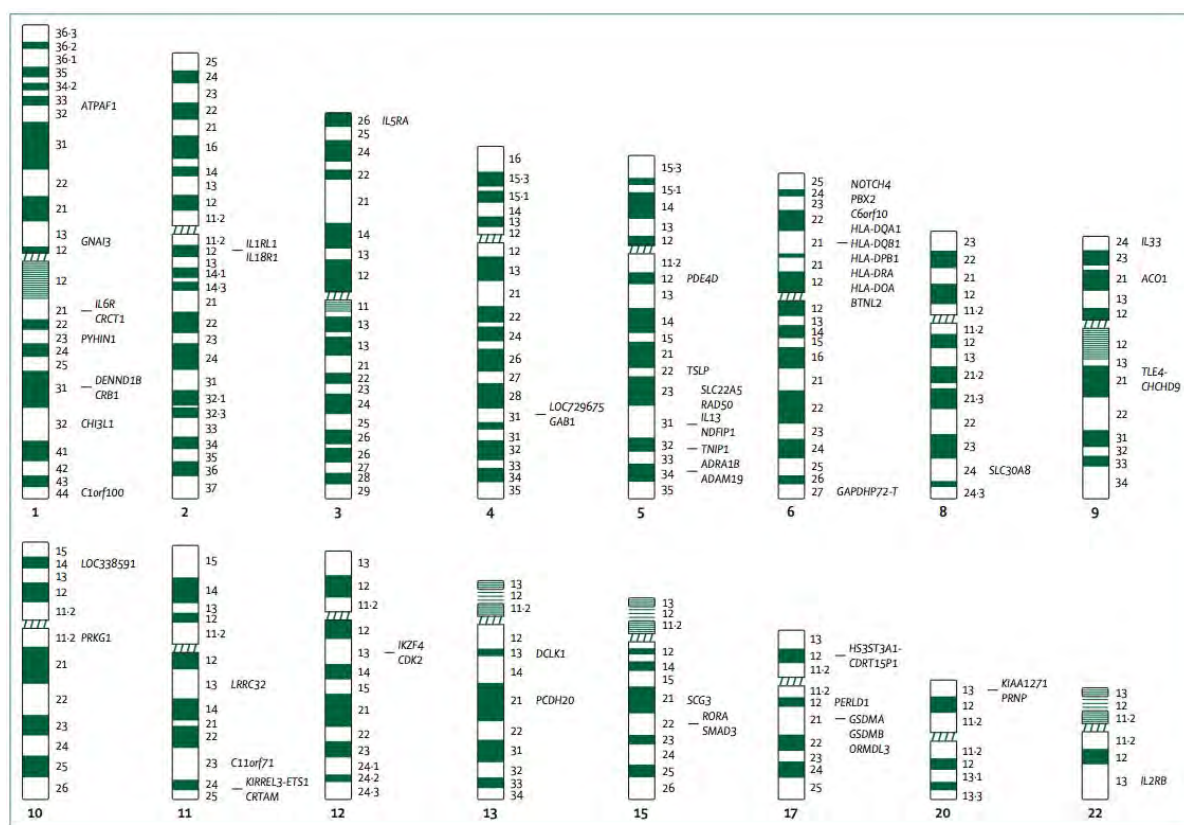
Les cellules épithéliales pulmonaires expriment tout un panel de « Pattern Recognition receptors » (PRR) leur permettant de détecter différents stimuli environnementaux, de sécréter des signaux de danger et orchestrer la défense de l'hôte contre les microorganismes et polluants inhalés. Chez les patients asthmatiques, la sensibilisation atopique avec l'allergène se fait généralement très tôt au cours de l'enfance. Ceci est dû à des altérations dans l'intégrité de la barrière épithéliale et une activation aberrante de l'épithélium. Ces altérations sont causées par une association complexe de facteurs génétiques de l'hôte et d'agressions environnementaux.

### b. Les facteurs génétiques

L'asthme, le psoriasis, la maladie Crohn et d'autres maladies touchant les épithéliums ont une forte composante génétique. Les analyses d'association pangénomiques (Genome Wide Association Study, GWAS) ont permis de mettre en évidence plusieurs gènes de susceptibilité à l'asthme. Parmi eux, plusieurs gènes font partie du « Epithelial Differentiation Complex » (EDC) qui se trouve au niveau de 1q21 (398). L'EDC est impliqué dans la différenciation et la maturation des cellules épithéliales. Récemment, d'autres loci de susceptibilité ont été

identifié. Par exemple, le gène qui code le « G-protein-coupled receptor for asthma susceptibility » (GPRA) qui se trouve au niveau du chromosome 7 est exprimé sous différentes isoformes chez les patients asthmatiques et les sujets sains (399). Ce gène, qui est exprimé préférentiellement au niveau de l'épithélium bronchique, jouerait un rôle dans le maintien de l'intégrité épithéliale.

Le GWAS a également permis d'identifier d'autres gènes de susceptibilité impliqués notamment dans la reconnaissance de pathogènes (ex. *NOD2*(400) , *CD14* (401), *TIM1*(399) , *TLR2* (402), *TLR10* (403)), la production de mucus (*IL13* (404)) et l'inflammation (ex. *TGF $\beta$*  (405), *TNFA* (406)). Ainsi, alors qu'on s'est longtemps concentré sur les gènes impliqués dans la balance Th1 - Th2, les GWAS ont démontré qu'une meilleure compréhension des mécanismes de défense épithéliale est essentielle pour développer des nouvelles thérapies.



**FIGURE 13: Gènes de susceptibilité à l'asthme allergique**

Les études d'association pangénomique ou GWAS (Genome-Wide Association studies) ont permis de mettre en évidence de nombreux gènes de susceptibilité à l'asthme allergique. Parmi ces gènes on retrouve en autres des cytokines Th2 (IL13), les cytokines favorisant les réponses Th2 (IL33, TSLP)

D'après Martinez *et al.* (407)

### c. Les facteurs environnementaux.

Les polluants tels que l’ozone, le dioxyde d’azote et les matières particulaires sont associés à une exacerbation de l’asthme et/ou son déclenchement. Les mécanismes exacts par lesquels les polluants vont induire des dommages au niveau pulmonaire sont peu connus mais il semblerait que des modifications génétiques et épigénétiques soient impliquées. Stefanowicz *et al.* ont effectivement mis en évidence des profils de méthylation différents au niveau d’une dizaine de gènes dans les cellules épithéliales pulmonaires entre des sujets asthmatiques et non-asthmatiques (408). Parmi ces gènes on retrouve STAT5 qui est impliqué dans la différenciation en Th2 (409), et CRIP1 dont la surexpression va favoriser la mise en place d’une réponse de type Th2 (410). De plus, le traitement de cellules épithéliales avec différents polluants induit l’expression de microARN qui sont capables d’altérer l’épigénome en agissant directement ou indirectement sur le remodelage de la structure de l’ADN. Ainsi, l’induction de miR-375 par ces polluants conduit à l’expression de Thymic Stromal lymphopoietin (TSLP) qui est un acteur majeur dans le déclenchement de l’asthme (411).

L’infection par certains virus est également reconnus comme un facteur à risque dans le déclenchement et l’exacerbation de l’asthme. Nicholson *et al.* ont détecté des virus chez plus de 40% de patients souffrant d’épisodes asthmatiques exacerbés dans leur cohorte (412). Les virus les plus souvent retrouvés étaient les rhinovirus suivis des coronavirus et des virus de l’influenza. Contoli *et al.* ont quant à eux mis en évidence des défauts dans la production d’IFN- $\lambda$  et IFN- $\beta$ , qui est induite par la signalisation des TLR, chez des patients asthmatiques (413). L’ensemble de ces données suggère que des altérations dans l’élimination du virus vont conduire à une persistance du pathogène causant ainsi des dommages au niveau de l’épithélium. A noter que l’asthme allergique peut être un facteur de risque pour différents types d’infections notamment par les pneumocoques (414).

### d. L’activation de l’épithélium

Les allergènes sont un mélange complexe de molécules biologiquement activées comprenant entre autres, des protéases, des chitines, des glycanes, des endotoxines et d’une variété de composants inconnus à ce jour (415). L’analyse de ces molécules a révélé que de nombreux allergènes environnementaux agissent comme des PAMPs (Pathogen Associated Molecular Pattern) capables d’activer divers récepteurs du système immunitaire, notamment les TLR (Toll-like Receptor) (416). Par exemple, les chitines peuvent activer le TLR2 et induire une réponse de type Th2 (417). En réponse à des allergènes inhalés, les cellules épithéliales pulmonaires vont sécréter différentes cytokines et chimiokines qui vont contribuer au recrutement, à la maturation et au conditionnement des DC.

## e. Molécules sécrétées par l'épithélium

### *GM-CSF*

Plusieurs allergènes sont capables d'induire une production de GM-CSF par les cellules épithéliales pulmonaires (418, 419). Les souris surexprimant cette cytokine développent un asthme allergique très sévère en réponse à un antigène normalement inoffensif (420, 421). Les DC dérivés de monocytes traités au GM-CSF, induisent préférentiellement la différenciation des LT CD4<sup>+</sup> en Th2 (422). L'administration d'acariens induit une réponse de type Th2 qui est partiellement médiée par la production endogène de GM-CSF. Dans ce même modèle d'asthme allergique, la neutralisation de cette cytokine diminue la sévérité de la pathologie (423).

### *TSLP*

En conditions inflammatoires, les cellules épithéliales pulmonaires mais également les mastocytes et les DC produisent du TSLP. En réponses à différents allergènes (ex. protéases, pathogènes, fumée de cigarette), les cellules épithéliales endommagées vont sécréter du TSLP qui va activer les DC et les conditionner pour induire une réponse Th2. Chez l'Homme, *TSLP* est un gène de susceptibilité dans l'asthme (424-426). En effet, son expression est augmentée chez les patients souffrant d'asthme sévère (427). Chez la souris, le blocage de TSLP permet la réversion de l'inflammation chronique et diminue le remodelage tissulaire (428). De façon intéressante, TSLP inhibe la fonction des Tregs démontrant le rôle important de l'épithélium pulmonaire dans la rupture de la tolérance immunitaire (429).

### *IL-25*

Les basophiles et les cellules épithéliales pulmonaires produisent de l'IL-25 en réponse à des allergènes et certains virus respiratoires (430, 431). Chez l'homme, les biopsies pulmonaires de patients asthmatiques ont révélé une augmentation dans le nombre de cellules productrices d'IL-25 et exprimant le récepteur à l'IL25 (IL25R) (432, 433). Chez la souris, une surexpression de cette cytokine induit un asthme allergique, probablement en conditionnant les DC à activer une réponse Th2 (430, 431). Le traitement avec des anticorps anti-IL25 diminue l'asthme allergique et le remodelage tissulaire (434).

### *IL33*

Cette cytokine de la famille de l'IL-1 est produite par les cellules épithéliales pulmonaires en réponse aux acariens ainsi que d'autres allergènes (435, 436). IL-33 induit un



signal en se liant à son récepteur qui est un hétérodimère constitué de ST2 et de IL-2RAcP. IL-33 induit la production de l'IL-5 et de l'IL-13 par les LT CD4<sup>+</sup> Th2 et l'activation des autres cellules exprimant son récepteur, notamment les mastocytes, les éosinophiles et les basophiles (437). Les GWAS ont démontré que des polymorphismes dans les gènes *IL33*, *IL1RL1* et *ST2* sont associés à l'asthme (424).

Ces trois cytokines ont des effets pléiotropes dans l'organisme mais elles ont toutes la capacité à conditionner les DC pour induire une réponse de type Th2 : Elles vont inhiber la production de l'IL-12 et induire l'expression de OX40L et ainsi favoriser la différenciation des LT CD4<sup>+</sup> naïfs en Th2 (438-441).

#### f. Activation des cellules dendritiques

La production de CCL2 et de CCL20 par l'épithélium pulmonaire activé va recruter les DC immatures et leurs précurseurs (442, 443). A ce jour, nous ne savons pas si les fonctions des DC dans la réponse asthmatique sont réalisées par une seule population cellulaire ou si plusieurs populations interviennent séquentiellement ou simultanément.

Chez la souris, plusieurs sous-populations de DC pulmonaires, caractérisées par l'expression différentielle de marqueurs de surface et par des localisations distinctes, ont été décrites. Ces différentes populations sont séparées en trois grands groupes : les DC conventionnelles CD11c<sup>high</sup> (cDC), les DC plasmacytoïdes CD11c<sup>dim</sup>, et les DC myéloïdes CD11b<sup>+</sup> (444).

Chez l'Homme, les cDC sont séparées en deux sous-catégories, les cDC de type 1 qui expriment le « blood dendritic cell antigen » (BDCA1 ou CD1c) et les cDC exprimant CD103 (BDCA2) et CD123 (445).

Les DC intraépithéliales sont situées au niveau de la couche basolatérale de l'épithélium pulmonaire. Elles sont séparées de l'air inhalé que par les jonctions serrées entre les cellules épithéliales. Ces DC vont prolonger leur dendrites à travers les jonctions, sans affecter la fonction de la barrière, et échantillonner le contenu de l'air inhalée. En absence de ligands de leur TLR et autres PRR, les DC pulmonaires présentent un état d'activation minimal. La reconnaissance de PAMPs augmente la mobilité et l'échantillonnage des DC. Une fois activées, les DC vont migrer dans les nœuds lymphatiques médiastinaux drainants. L'expression de CCR7 est essentielle à cette migration (446). L'observation que la déplétion des DC pulmonaires réduit grandement la réponse immunitaire montre que le rôle de la lymphe dans le transport passif d'antigène est minimal (447). Sous l'effet des différentes

cytokines du microenvironnement pulmonaire, les DC vont préférentiellement induire la différenciation des LT CD4<sup>+</sup> en Th2.

#### g. Recrutement des LT au niveau du poumon

La réponse allergique peut être divisée en deux phases ; précoce et tardive. La réponse précoce se met en place en moins d'une heure suivant l'exposition à l'allergène. Elle résulte de la dégranulation des mastocytes et la libération de différents médiateurs conduisant à une bronchoconstriction(448). Cette phase précoce est souvent résolue rapidement mais elle est suivie de la phase tardive induite par l'infiltration des cellules inflammatoires comme les LT et les éosinophiles (449). La phase tardive peut s'étendre sur un grand laps de temps. De plus, l'exposition récurrente ou constante à des allergènes maintient l'inflammation et le remodelage tissulaire permanent chez les patients souffrant d'asthme chronique (448, 449)

Le recrutement des LT au niveau des poumons est essentiel pour l'induction de l'asthme allergique. En effet, le blocage de la signalisation des récepteurs couplés aux protéines G (GPCR, impliqués entre autres dans la détection de chimiokines) dans les LT inhibe le développement de l'inflammation pulmonaire (450, 451).

Lors de la phase précoce, les mastocytes vont libérer des quantités importantes de leukotriene B4 (LTB<sub>4</sub>), le ligand du récepteur BLT1 exprimé par les Th1, Th2 et Th17 qui vont pouvoir migrer vers les poumons (452). Une déficience en BLT1 conduit à des défauts dans l'accumulation des LT lors de la phase précoce dans un modèle d'asthme allergique induite par immunisation avec un allergène (452, 453). Les mastocytes produisent également du CCL1, CCL17 et CCL22 (454, 455). L'expression de CCL1 par les mastocytes semble être un élément clé dans le recrutement des Th2 qui expriment son récepteur, le CCR8 (454). Le récepteur « chemoattractant receptor homologous molecule expressed on Th2 cells » (CRTH2), qui est exprimé par les Th2 humains, permet lui aussi la migration des cellules au niveau pulmonaire. Ce récepteur va reconnaître les prostaglandines D2 (PGD<sub>2</sub>) libérées par les mastocytes (456). La cinétique rapide de sécrétion de chimiokines par les mastocytes suggère que les LT impliqués dans la phase précoce sont principalement des LT mémoires résidents spécifiques d'allergènes.

Lors de la phase tardive, les macrophages et les cellules épithéliales endommagées libèrent du CXCL10 et du CCL20 (443, 457). Les récepteurs à ces chimiokines, CXCR3 et CCR6 respectivement, sont exprimés par les LT infiltrant les poumons lors de l'inflammation un jour après contact avec l'allergène (458, 459). Les souris déficientes pour CCR6 et CXCL10 développent un asthme allergique moins sévère (460-462). D'autres récepteurs comme CCR4 et CCR8 sont également impliqués dans la migration des Th2 (463). A noter que les Treg CD4<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> expriment CCR4 et CCR8 et sont donc potentiellement recrutés par



la libération de CCL1 lors de la phase précoce et par la libération de CCL17, CCL22 et CCL8 lors de la phase tardive (464).

## 2. Rôle des cellules immunitaires innées dans l'asthme

### Les mastocytes

Les mastocytes, qui se différencient au niveau de la moelle osseuse, résident classiquement dans les tissus où ils peuvent survivre pendant des mois voire des années. Chez les personnes allergiques, les mastocytes présentent déjà, par les récepteurs Fc $\epsilon$ RI, des IgE spécifiques d'allergènes. Une réexposition à ces allergènes va induire l'agrégation de ces récepteurs et la dégranulation des mastocytes (465). Ces cellules vont libérer différents médiateurs impliqués dans la phase immédiate (précoce) de la réaction allergique. Parmi ces médiateurs, on retrouve ceux contenus dans des granules cytoplasmiques préformés (histamine, sérotonine et protéases) ou nouvellement synthétisés (les médiateurs lipidiques comme les prostaglandines et les leukotriènes) qui peuvent être libérés en à peine quelques minutes après l'exposition à l'allergène. D'autres molécules comme les cytokines, chimiokines et facteurs de croissance seront sécrétées plusieurs heures après activation des mastocytes. Ces médiateurs vont induire la vasodilatation, l'œdème et/ou la constriction des bronches (466). Mise à part la ligation des Fc $\epsilon$ RI, la dégranulation de mastocytes peut également être induite par la reconnaissance de PAMPs (467, 468) ou par d'autres stimuli comme TSLP (469) et l'IL-33 (470).

Le rôle des mastocytes a été extensivement étudié aussi bien chez l'Homme que chez la souris. Les biopsies (471, 472) et l'analyse de tissus prélevés lors d'autopsie (473, 474) ont mis en évidence une augmentation des mastocytes au niveau des muscles lisses pulmonaires chez les patients asthmatiques. L'utilisation des souris déficientes pour les mastocytes a démontré que ces cellules contribuent de façon importante à la métaplasie des cellules à mucus et au remodelage tissulaire (475, 476).

### Les basophiles

Les basophiles sont phénotypiquement et fonctionnellement proches des mastocytes. Elles expriment les mêmes récepteurs Fc $\epsilon$ RI et libèrent des médiateurs similaires notamment l'histamine, les prostaglandines et les leukotriènes. En condition inflammatoire, la libération de TSLP par l'épithélium pulmonaire et l'IL-3 par les LT va induire une augmentation du nombre de basophiles (477, 478). Wakahara *et al.* ont récemment démontré que les basophiles sont capables d'augmenter la capacité des DC à induire une réponse Th2 et d'exacerber l'inflammation pulmonaire (479). Les basophiles sont retrouvés en quantité importante dans

les poumons de personnes asthmatiques (480). Cependant, les données récentes de littérature suggèrent que les basophiles ne sont pas essentiels à l'induction de la réponse allergique. En effet, les souris déficientes en basophiles développent un asthme allergique aussi sévère que les souris sauvages (481, 482).

### Les éosinophiles

Les éosinophiles sont associés à la pathogénèse de l'asthme et leur accumulation est considérée comme l'une des caractéristiques d'une réponse allergique pulmonaire aussi bien chez l'Homme que chez la souris (483-485). L'IL-5 produite par les Th2 et/ou les ILC2 (voir plus loin) va augmenter la production d'éosinophiles (483, 486) qui vont migrer vers les poumons en réponse aux chimiokines CCL11 et CCL24 produites par les cellules épithéliales lors de l'inflammation (487, 488). Lors de la réponse allergique, les eosinophils vont libérer différents médiateurs de l'inflammation tels que des cytokines (IL-1,-2,-3,-4,-5,-12,-13, TNF $\alpha$  et GM-CSF), des médiateurs lipidiques (LTB<sub>4</sub>, LTC<sub>4</sub> et PAF) et des chimiokines (IL-8, RANTES et MIP- $\alpha$ ). Chez l'Homme, les traitements des patients asthmatiques avec des anti-inflammatoires (corticostéroïdes) conduit à une réduction importante dans le nombre d'éosinophiles dans les BAL et dans les poumons et à l'amélioration des symptômes de l'asthme. L'ensemble de ces données suggérerait un rôle essentiel des eosinophils dans la physiopathologie de l'asthme allergique (489, 490). Cependant, les études menées chez des souris déficientes en éosinophiles sont venues contredire cette hypothèse. Les mutations dans le gène de GATA-1 conduit à une déficience en éosinophiles. Ce même phénotype est retrouvé chez les souris déficientes en IL-5. En utilisant ces souris, Hogan *et al.* et Humble *et al.* ont démontré qu'en absence d'éosinophiles, l'AHR (airway hyperreactivity ou hyperréactivité bronchique) est aussi sévère que chez les souris sauvages (491, 492). Il est important de noter que d'autres équipes ont obtenus des résultats contradictoires en utilisant des souris sous un fond génétique différent (493, 494). Ainsi le rôle des eosinophils dans l'asthme allergique reste controversé.

### Les neutrophiles

Malgré le fait que l'asthme a été associé pendant longtemps à la présence des éosinophiles au niveau des poumons, plusieurs études récentes ont démontré que certains patients asthmatiques présentent une infiltration massive de neutrophiles (466). Le rôle précis des neutrophiles dans la pathogénèse de l'asthme est compliqué à étudier. En effet, le traitement classique de l'asthme à base de glucocorticoïdes augmente la survie des

neutrophiles (495). Ainsi, on ne se sait toujours pas si l'asthme 'neutrophilique' représente une forme unique de l'asthme ou un stade de sévérité différente.

### Les « innate lymphoid cells » de type 2

Les « innate lymphoid cells » (ILC) sont des sources importantes de cytokines de type Th1 (ILC1), Th2 (ILC2) et Th17 (ILC3) (496). Les ILC sont morphologiquement proches des LT mais n'expriment pas de TCR. Cependant, le développement des ILC requiert les mêmes facteurs de transcription que celui des cellules Th : T-bet pour Th1 et ILC1, GATA-3 pour Th2 et ILC2 et RAR-related orphan receptor (ROR $\gamma$ ) pour Th17 et ILC3 (497-499).

Les ILC2 ont été identifiés pour la première fois au niveau du péritoine murin. Ces cellules expriment c-kit, Sca-1 (stem cell antigen 1), l'IL-7R et l'IL-33R. Elles produisent des quantités importantes d'IL-5 en réponse à l'IL-33 (500). Chez l'Homme, la population homologue, qui est lin<sup>-</sup>IL-7R<sup>+</sup>CRTH2<sup>+</sup>IL-33R<sup>+</sup>CD161<sup>+</sup> (501), est retrouvée dans le sang et les poumons de patients asthmatiques (502).

L'administration d'IL-25 et IL-33 chez des souris dépourvues de LT et de LB (RAG<sup>o</sup>) induit un asthme allergique et une production d'IL-13 par des ILC2 (503). L'administration de ces mêmes cytokines chez des souris sauvages induit une accumulation d'ILC2 dans les poumons, les lavages broncho-alvéolaires (BAL) et les nœuds lymphatiques drainant. De façon importante, plus de 50% des cellules IL-5<sup>+</sup>IL-13<sup>+</sup> dans les BAL et les poumons sont des ILC2 (504). Le transfert adoptif d'ILC2 dans des souris RAG<sup>o</sup> induit un asthme allergique en réponse à une protéase, la papaïne (505).

## 3. Rôle des cellules du système immunitaire adaptative dans l'asthme

### a. Les LT CD4<sup>+</sup>

#### Les Th2

Les patients asthmatiques présentent une infiltration accrue en Th2 au niveau pulmonaire (506, 507) et la proportion de Th2 infiltrant corrèle avec la sévérité de la pathologie (508). De plus, les immunothérapies visant à modifier les réponses Th2 en Th1 permettent d'atténuer l'inflammation pulmonaire (509-511). L'utilisation de modèles murins d'asthme allergique a permis de démontrer la capacité des Th2 à initier et à maintenir la physiopathologie caractéristique de l'asthme allergique. En effet, Cohn *et al.* ont démontré que le transfert adoptif de Th2 chez des souris sauvages induit une inflammation pulmonaire (512). La surexpression d'IL-4 (513), d'IL-13 (514) ou d'IL-5 (515) au niveau des poumons induit une sécrétion de mucus, une infiltration d'éosinophiles, l'AHR et le remodelage

tissulaire. Zhang *et al.* ont quant à eux démontré que la répression de GATA3, le facteur de transcription essentiel à la différenciation des Th2, permet d'atténuer l'inflammation pulmonaire (516). L'ensemble de ces données ont permis d'établir le rôle critique des Th2 dans l'asthme allergique. Cependant, vu que les ILC2 sont eux aussi dépendants de GATA3 et produisent des cytokines de type Th2 (voir plus haut), une réévaluation de l'importance des Th2 dans l'asthme allergique sera sans doute nécessaire.

### *Les Th1*

Le transfert adoptif de Th1 dans des souris sauvages n'induit pas d'asthme allergique (512). Cependant, chez les patients souffrant d'asthme sévère, on retrouve une augmentation de la proportion de Th1 aussi bien dans le sang que dans les fluides bronchio-alvéolaires (BAF) (517). Ainsi, l'induction de Th1 lors de l'asthme allergique aurait pour but de diminuer la différenciation en Th2. Un argument en faveur de cette hypothèse est le fait que les souris déficientes pour T-bet, le facteur de transcription essentiel à la différenciation des Th1, développent spontanément une AHR et présentent une éosinophilie qui dépend de l'IL-13 (518).

### *Les Th17*

Les Th17 expriment le facteur de transcription ROR $\gamma$ t, nécessaire à leur différenciation, et produisent de l'IL-17. Chez les patients asthmatiques, on retrouve des niveaux élevés d'IL-17A (519, 520). De façon importante, il existe une corrélation entre le niveau de l'IL-17 et la sévérité de la maladie plus particulièrement chez les sujets souffrant d'asthme neutrophilique (520). De plus, Pene *et al.* ont mis en évidence des LT CD4<sup>+</sup>IL17<sup>+</sup> au niveau des poumons de patients asthmatiques (521). Chez la souris, les Th17 exacerbent l'inflammation pulmonaire induite par les Th2 (522). Plus récemment, McKinley *et al.* ont démontré que le transfert de Th17 spécifique d'ovalbumine (OVA) favorise la mise en place de l'AHR et de l'inflammation au niveau des poumons dans un modèle d'asthme allergique expérimentale induite par l'OVA (523). Ainsi, tout comme les Th2, les Th17 jouent un rôle délétère lors des réponses allergiques.

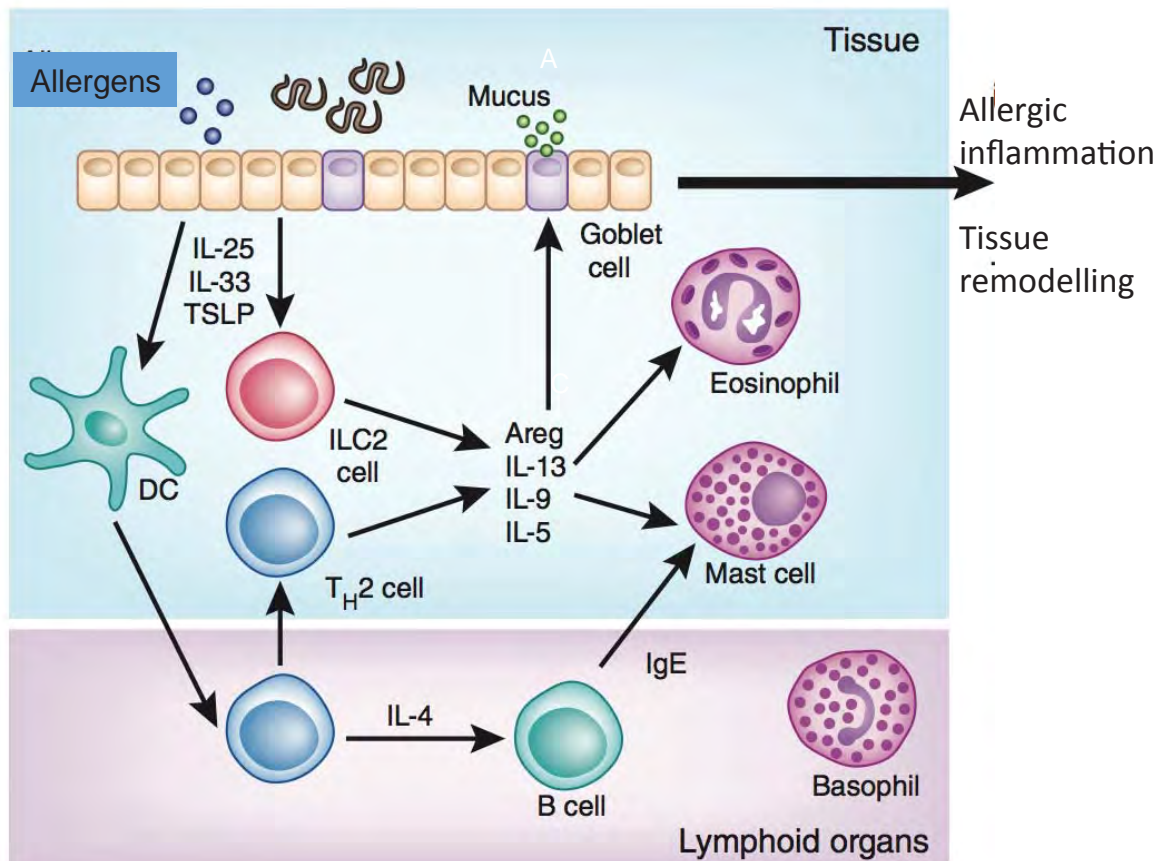
### *b. Les lymphocytes T $\gamma\delta$*

Wands *et al.* ont mis en évidence une sous-population de LT $\gamma\delta$  au niveau des poumons étroitement associée à l'épithélium (524). La proportion de ces cellules est augmentée dans les BAL de patients asthmatiques où elles produisent des quantités importantes d'IL-4 en réponse à des allergènes (525). A ce jour le rôle de cette population pulmonaire chez

l'Homme n'a pas été évalué. Chez la souris, deux sous-populations pulmonaires des LT $\gamma\delta$  ont été identifiées l'une exprimant le TCR V $\gamma$ 1 et l'autre le TCR V $\gamma$ 4 (526, 527). Les LT $\gamma\delta$  V $\gamma$ 1<sup>+</sup> sont pro-inflammatoires, produisent de l'IL-5 et de l'IL-13 et sont impliquées dans l'induction de l'AHR. Quant aux LT $\gamma\delta$  V $\gamma$ 4<sup>+</sup>, ils ont une capacité immunosuppressive et peuvent contrôler l'inflammation pulmonaire (528). Il se peut donc que ces cellules agissent séquentiellement pour dans un premier temps participer à la mise en place de l'inflammation en réponse à des antigènes et dans un deuxième temps contribuer au contrôle de la réponse inflammatoire et à sa résolution.

### c. Les NKT

Le nombre de NKT est plus important chez les patients asthmatiques que chez des sujets sains (529, 530). Chez la souris, le traitement avec le ligand des NKT, l' $\alpha$ -Gal-Cer, induit une production d'IL-13 et de TSLP par les NKT, ce qui favorise l'AHR (531). Inversement, les souris déficientes en NKT sont résistantes au développement de l'asthme allergique (532). Ces données suggèrent une action délétère des NKT dans les réponses aux allergènes.



**FIGURE 14: Initiation et propagation de la réponse Th2 lors de l'asthme allergique**

Chez les personnes prédisposées, l'inhalation d'allergènes va induire des dysfonctionnement au niveau de l'épithélium pulmonaire. Les cellules épithéliales vont ainsi produire différentes cytokines (IL-25, IL-33 et TSLP) qui vont d'un part conditionner les cellules dendritiques pulmonaires à initier une réponse Th2 et d'autre part induire l'activation et la production de cytokines Th2 par les ILC2 (type 2 innate lymphoid cells) résidents. Les cellules dendritiques migrent vers les nœuds lymphatiques drainants et activent la différenciation de lymphocytes T spécifiques d'allergènes en Th2 qui vont ensuite migrer au niveau des poumons. L'action combinée de Th2 et ILC2 va induire l'inflammation allergique caractérisée par la production d'IgE par les lymphocytes B, la dégranulation des mastocytes et des basophiles, l'éosinophilie pulmonaire. Cette réponse allergique va éventuellement conduire au remodelage tissulaire au niveau des poumons.

Areg: amphiregulin; DC: dendritic cells

D'après Licona-Limon *et al.* (533)

## 4. Rôle des Tregs dans l'asthme

### Les Treg CD4<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>

Chez l'Homme, les mutations dans le gène de Foxp3 conduit à un syndrome auto-immun létal, l'IPEX (Voir plus haut). Les patients souffrant d'IPEX présentent également des symptômes d'allergies tels que l'éosinophilie, une concentration sérique d'IgE élevée et de l'eczéma (231). Ling *et al.* ont démontré que la stimulation de cellules mononuclées du sang périphérique (PBMC), provenant de sujets sains, avec des allergènes induit une prolifération et une production de cytokines Th2 plus importantes après déplétion en cellules CD25<sup>+</sup> (534). L'ensemble de ces données suggère que les Treg Foxp3<sup>+</sup> inhibent les réponses anti-allergènes chez les individus sains.

Lewkowich *et al.* ont démontré que la déplétion de cellules CD25<sup>+</sup> chez la souris avant la sensibilisation avec un allergène conduit à une augmentation de la réponse Th2, de la concentration sérique d'IgE, de l'éosinophilie et de l'AHR (535). De façon complémentaire, Kearley *et al.* ont eux démontré que le transfert adoptif de LT CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> avant l'administration intranasale d'antigène permet de réduire significativement l'inflammation pulmonaire dans un modèle d'asthme allergique induite par l'OVA (536). Plus récemment, Rubtsov *et al.* ont généré par KO conditionnel, des souris où uniquement les cellules Foxp3<sup>+</sup> ne peuvent plus produire de l'IL-10. Ces souris développent une inflammation pulmonaire plus sévère que les souris contrôles. Ainsi, les Treg Foxp3<sup>+</sup> contrôlent les réactions allergiques par un mécanisme dépendant de l'IL-10 (537).

### Les Tr1

Chez les individus sains, les Tr1 constituent la principale sous-population de LT spécifiques d'allergènes environnementaux (312). *In vitro*, les Tr1 inhibent la sécrétion d'IgE par les lymphocytes B tout en favorisant la production d'IgG4 par ces cellules (538). Les patients asthmatiques traités par immunothérapies allergéniques (exposition à des doses croissantes d'allergènes afin d'induire une tolérance à long-terme) présentent une augmentation dans la proportion des Tr1 circulants (539). Chez la souris, le transfert adoptif de LT transgéniques exprimant constitutivement de l'IL-10, inhibe efficacement l'asthme allergique (540).



## 5. Rôle des LT CD8<sup>+</sup> dans l'asthme allergique

### Les LT CD8<sup>+</sup> conventionnels

Alors que le rôle des LT CD4<sup>+</sup> Th2 dans la physiopathologie de l'asthme allergique a été clairement démontré, l'implication exacte des LT CD8<sup>+</sup> dans ce phénomène reste à ce jour inconnue. En effet, alors que des études ont pu mettre en évidence un rôle bénéfique des LT CD8<sup>+</sup> dans l'asthme, d'autres ont quant à eux démontré un rôle délétère.

Sedgwick et al. ont démontré que dans un modèle d'asthme allergique induite par l'OVA, l'inhalation de cet antigène induit l'activation des LT CD8<sup>+</sup> qui sont ensuite capables d'inhiber la sécrétion d'IgE après transfert adoptif dans des souris sensibilisées à l'OVA (541). Le mécanisme permettant au LT CD8<sup>+</sup> d'induire cette immunosuppression est complexe. En effet, les LT CD8<sup>+</sup> antigène-spécifiques vont interagir avec des cellules dendritiques conduisant à la production d'IL-12 et d'IL-18 par ces cellules présentatrices d'antigènes. Cette production cytokinique va polariser des LT CD4<sup>+</sup> naïfs en Th1. Ces derniers vont ensuite sécréter de l'IFN- $\gamma$  qui va atténuer la production d'IgE par les LB (542). Chez le rat, la déplétion de cellules CD8<sup>+</sup> conduit à une exacerbation de l'inflammation, de la production de mucus et du remodelage tissulaire au niveau des poumons (543, 544). Stock et al. ont démontré que ce même type de déplétion chez les souris BALB/c avant la sensibilisation avec l'antigène conduit à une réponse Th2 exacerbée et une inflammation pulmonaire plus sévère (545). Ces études suggèrent donc un rôle protecteur des LT CD8<sup>+</sup> l'asthme allergique.

Cependant, dans des modèles d'inflammation pulmonaire chez la souris C57BL/6, la déplétion des LT CD8<sup>+</sup> avant la sensibilisation à l'antigène, a tendance à atténuer les réponses allergiques en réponse à cet antigène. En effet, Hamelmann et al. ont démontré que l'utilisation d'anticorps anti-CD8 déplétants chez des souris C57BL/6 thymectomisées à 3-4 semaines, inhibe complètement l'AHR et l'infiltration pulmonaire des éosinophiles suite à l'inhalation répétée d'OVA (546). Miyahara et al. ont quant à eux démontré que les souris CD8 KO, de fond génétique C57BL/6 développent une inflammation moins sévère que les souris sauvages (547). De plus, le transfert adoptif de LT CD8 $\alpha\beta$ <sup>+</sup> chez des souris sauvages conduit à une inflammation pulmonaire plus sévère dans un modèle d'asthme allergique induit par l'ovalbumine (548-550).

Les données contradictoires des études murines peuvent éventuellement s'expliquer par l'utilisation de souris de fonds génétiques différents. En effet, la réponse anticorps et l'AHR est plus robuste chez les BALB/c que chez les C57BL/6 alors que ces derniers présentent plus

d'éosinophiles dans les BALF (551). Ainsi, à ce jour le rôle des LT CD8<sup>+</sup> conventionnel dans les réponses allergiques reste controversé.

### Les LT CD8<sup>+</sup> régulateurs

A ce jour, il n'existe pas d'études ayant évalué l'implication des différentes populations de Treg CD8<sup>+</sup> décrites précédemment dans le contrôle des réponses allergiques. Ces études sont actuellement difficiles à mettre en place en absence de marqueurs spécifiques de ces populations et de caractérisation de leur mécanismes de suppression (552).

# *RÉSULTATS*

## Objectifs

Notre équipe a mis en évidence la capacité des Treg  $CD8^+CD28^{low}$  à inhiber l'inflammation intestinale dans un modèle murin de colite expérimentale induite par l'injection de cellules colitogènes chez des souris lymphopéniques. Nous avons également démontré que cette protection dépend d'une production d'IL-10 par les Treg et une sensibilité des cellules colitogènes au TGF- $\beta$ . Par la suite, nous sommes concentrés sur trois questions importantes concernant les Treg  $CD8^+CD28^{low}$  : les facteurs impliqués dans leur développement, leur origine et leur fonction(s) physiologique(s).

L'inflammation intestinale fait partie des symptômes des patients et souris présentant des mutations dans le gène de Aire. Aire étant impliqué dans le façonnement du répertoire TCR des LT dans le thymus, nous avons évalué le rôle éventuel de ce facteur de transcription dans le développement des Treg  $CD8^+CD28^{low}$  qui ont la capacité de prévenir la colite. Pour cela, nous avons réalisé une étude comparative entre les LT  $CD8^+CD28^{low}$  provenant de souris sauvages et déficientes pour Aire. Ainsi nous avons analysé la proportion, le phénotype, le répertoire et la capacité immunosuppressive *in vitro* des  $CD8^+CD28^{low}$  Aire<sup>o</sup>. Ensuite, nous avons testé la capacité de ces cellules à prévenir l'inflammation intestinale dans notre modèle de colite expérimentale. Nos résultats montrent que AIRE joue un rôle important dans la fonction *in vivo* de ces Treg en altérant probablement leur répertoire de TCR. L'ensemble de ce travail a fait l'objet d'une publication en 2011.

AIRE étant exprimé aussi bien au niveau du thymus et en périphérie, cela ne nous permettait pas de conclure sur l'origine des Treg  $CD8^+CD28^{low}$ . Les données récentes de la littérature suggèrent que les nTreg (qui se développent dans le thymus) et les iTreg (qui se différencient en périphérie) n'ont pas la même fonction dans la régulation de la réponse immunitaire. Ainsi, l'identification de l'origine d'une population de Treg donnée constitue une étape clé dans la détermination de leur fonction physiologique. Cela permettra également d'étudier les facteurs moléculaires et cellulaires impliqués dans ce développement et qui sont différents selon le lieu de différenciation. Afin de déterminer l'origine de Treg  $CD8^+CD28^{low}$ , nous avons évalué la présence de cellules au niveau du thymus, analysé leur apparition au cours de l'ontogénie et étudié leur répertoire TCR. Nous avons également évalué la présence de cette population régulatrice chez l'Homme. Nos résultats montrent que les LT  $CD8^+CD28^{low}$  possédant une capacité immunosuppressive se développent *de novo* dans le thymus. Ce développement qui se fait en parallèle les LT conventionnels requiert l'expression du CMH-I sur les cellules épithéliales thymiques. Nous avons également pu mettre en évidence une population homologue dans le sang de sujets sains et dans des échantillons de

thymus humains. Ces résultats sont présentés sous forme d'un article scientifique qui a été soumis pour publication en 2014.

Par la suite, on s'est intéressé au rôle physiologique des Tregs  $CD8^+CD28^{low}$ . L'absence de marqueurs spécifiques ne permettant pas de dépléter spécifiquement cette population, nous avons utilisé un système de KO-conditionnel afin d'invalider l'un des mécanismes immunosuppresseurs clé, qu'est la production d'IL-10. Nous avons donc généré des souris présentant une délétion spécifique de l'*Il10* au niveau des LT  $CD8^+$  (souris cKO). L'IL-10 étant une cytokine immuno-modulatrice essentielle au contrôle des réponses immunitaires particulièrement au niveau des muqueuses, nous avons évalué la susceptibilité de ces souris à développer une inflammation pulmonaire dans un modèle d'asthme allergique. Nous avons ensuite évalué la sévérité de la réponse allergique de ces souris dans un modèle d'asthme allergique avec ou sans transfert adoptif de Treg  $CD8^+CD28^{low}$  sauvage. Nos résultats montrent que l'IL-10 produit par les LT  $CD8^+$  est essentielle au maintien de l'homéostasie immunitaire au niveau pulmonaire. En effet, les souris cKO développent une réponse allergique plus sévère. De façon importante, nous montrons également que le transfert d'une seule population de Treg  $CD8^+$  sauvages, notamment les  $CD8^+CD28^{low}$ , permet de prévenir cette inflammation accrue. Ces résultats sont présentés sous forme d'un article scientifique qui sera soumis prochainement pour publication.

# AIRE-deficient CD8<sup>+</sup>CD28<sup>low</sup> regulatory T lymphocytes fail to control experimental colitis

Céline Pomié<sup>1,2,3</sup>, Rita Vicente<sup>1,2,3</sup>, Yirajen Vuddamalay<sup>1,2,3</sup>, Brita Ardesjö Lundgren<sup>4</sup>, Mark van der Hoek<sup>5,6</sup>, Geneviève Enault<sup>1,2,3</sup>, Jérémy Kagan<sup>1,2,3</sup>, Nicolas Fazilleau<sup>1,2,3</sup>, Hamish S. Scott<sup>4,6,7</sup>, Paola Romagnoli<sup>1,2,3</sup>, and Joost P.M. van Meerwijk<sup>1,2,3,8</sup>

<sup>1</sup> Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (Inserm), U1043, Toulouse, F-31300, France; <sup>2</sup> Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS), U5282, Toulouse, F-31300, France; <sup>3</sup> Université de Toulouse, Université Paul Sabatier, Centre de Physiopathologie de Toulouse Purpan (CPTP), Toulouse, F-31300, France; <sup>4</sup> Department of Molecular Pathology, The Centre for Cancer Biology, the Institute of Medical and Veterinary Science and The Hanson Institute, SA Pathology, Box 14 Rundle Mall Post Office, Adelaide, SA 5000; <sup>5</sup> Adelaide Microarray Centre, SA Pathology, Frome Road, Adelaide, South Australia, Australia, 5000; <sup>6</sup> School of Molecular and Biomedical Science, University of Adelaide, South Australia, Australia, 5000, <sup>7</sup> the Adelaide Cancer Research Institute, The School of Medicine University of Adelaide, SA, 5005, Australia; and <sup>8</sup> Institut Universitaire de France, Paris, F-75000 France.

Corresponding author:

Prof. Joost P.M. van Meerwijk, PhD., Inserm U1043, BP 3028, 31024, Toulouse  
Cedex 3, France, Phone +33 562 748381, FAX +33 562 744558, E-mail Joost.van-  
Meerwijk@inserm.fr

Abbreviations used: AIRE, Autoimmune regulator; APECED, Autoimmune  
PolyEndocrinopathy Candidiasis Ectodermal Dystrophy; IBD, inflammatory bowel  
disease; Treg, regulatory T lymphocyte



## ABSTRACT

Mutations in the gene encoding the transcription factor AutoImmune REgulator (AIRE) are responsible for the 'Autoimmune PolyEndocrinopathy Candidiasis Ecdermal Dystrophy' syndrome. AIRE directs expression of tissue restricted antigens in the thymic medulla and in lymph node stromal cells and thereby substantially contributes to induction of immunological tolerance to self-antigens. Data from experimental mouse models showed that AIRE-deficiency leads to impaired deletion of autospecific T cell precursors. However, a potential role for AIRE in the function of regulatory T cell populations, which are known to play a central role in prevention of immunopathology, has remained elusive. Regulatory T cells of CD8<sup>+</sup>CD28<sup>low</sup> phenotype efficiently control immune responses in experimental autoimmune and colitis models in mice. We here show that CD8<sup>+</sup>CD28<sup>low</sup> Treg from AIRE-deficient mice are transcriptionally and phenotypically normal, exert efficient suppression of *in vitro* immune responses, but completely fail to prevent experimental colitis *in vivo*. Our data therefore demonstrate that AIRE plays an important role in the *in vivo* function of a naturally occurring regulatory T cell population.

\body

## Introduction

Immunological homeostasis of the organism is maintained by a large variety of mechanisms. One of these mechanisms involves induction of tolerance to self-antigens, which is at least in part acquired during T cell development in the thymus where autospecific T cell-precursors undergo negative selection and either die by apoptosis or are rendered functionally anergic (1). Despite the substantial quantitative impact of these mechanisms (2), some autospecific T cells leave the thymus (3). Such cells are kept under control by peripheral tolerance mechanisms that include induction of apoptosis and anergy (4) and the activity of CD4<sup>+</sup> or CD8<sup>+</sup> regulatory T lymphocyte populations (Treg)(5, 6). Treg not only control immune responses to self-, but also to non self-antigens, e.g. during infection and pregnancy, as well as in the gut (7-9). Their therapeutic potential has been demonstrated in experimental autoimmune and transplantation-models (10-12).

Whereas the best studied Treg population is of CD4<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> phenotype, other Treg populations have also been described and may play very important roles in physiology. One of these populations expresses CD8 and low levels of the co-stimulatory molecule CD28. These cells were originally described in cultures of human lymphocytes that, after repeated *in vitro* stimulations, lost proliferative capacity (13). Later, they were identified in unmanipulated mice and shown to suppress *in vitro* T cell responses and to prevent experimental autoimmune encephalomyelitis (14). We showed that experimental colitis induced by injection of naïve T cells into immunodeficient animals could efficiently be prevented by co-injection of CD8<sup>+</sup>CD28<sup>low</sup> Treg (15).

Mutations in the gene encoding the transcription factor AutoImmune REgulator (AIRE) are responsible for the immune-disorder Autoimmune PolyEndocrinopathy Candidiasis Ectodermal Dystrophy (APECED)(16, 17). This disease is mainly characterized by chronic mucocutaneous candidiasis, hypoparathyroidism and adrenocortical insufficiency. Also AIRE-deficient (AIRE<sup>o</sup>) mice develop an autoimmune pathology similar to APECED (18-22). Interestingly, it was recently shown that also the candidiasis is probably due to an autoimmune disorder: APECED patients had neutralizing antibodies to Th17 associated cytokines known to be involved in immunity to fungi (23, 24). These observations indicate that AIRE is required for the control of immune responses to self-antigens. AIRE promotes promiscuous expression of tissue-restricted antigens in the thymic medulla and by lymph node stromal cells thereby inducing immunological tolerance (25-27). Evidence from TCR-transgenic mouse models shows that expression of neo self-antigens leads to deletion of specific thymocytes, and that in AIRE<sup>o</sup> mice deletion of TCR-transgenic thymocytes was severely impaired (28-30). AIRE also drives expression of chemokines by mTEC (31), e.g. XCL1 that is involved in the medullary accumulation of thymic dendritic cells (32). In AIRE<sup>o</sup> mice marginally reduced numbers of CD4<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> Treg may develop. However, molecular analysis of the TCR-repertoire of wt and AIRE<sup>o</sup> CD4<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> Treg failed to detect any difference and these cells have unaltered *in vitro* and *in vivo* suppressive activity (20, 21, 30, 32, 33). In APECED patients decreased expression of Foxp3 and impaired suppressive function of Treg was observed (34).

Since diarrhea and other gastrointestinal disorders are among the multiple symptoms and sometimes even dominate the clinical picture of the APECED syndrome (35), it is important to understand the role of AIRE in development of T-cell populations

thought to play a key role in the maintenance of immunological homeostasis in the gut. Human CD8<sup>+</sup> T cells from healthy colon biopsies have *in vitro* suppressive activity. In contrast, CD8<sup>+</sup> T cells from colon biopsies affected with inflammatory bowel disease (IBD) lack such *in vitro* suppressive activity (36). In mice, CD8<sup>+</sup> cells play a crucial role in the induction of intestinal tolerance to orally administered antigens (37). We previously demonstrated that CD8<sup>+</sup>CD28<sup>low</sup> T cells prevent experimental colitis in mice (15). Also intestinal CD8αα<sup>+</sup> T cells have been shown to control experimental colitis (38). Combined, these data strongly suggest an important role for CD8<sup>+</sup> Treg in control of immune-homeostasis in the intestines. We therefore assessed the capacity of AIRE<sup>o</sup> CD8<sup>+</sup>CD28<sup>low</sup> Treg to prevent experimental IBD.

## Results

### *Quantitatively unaltered development of transcriptionally and phenotypically normal CD8<sup>+</sup>CD28<sup>low</sup> Treg in AIRE<sup>o</sup> mice*

Despite elegant attempts (30), no direct experimental data exist showing that AIRE-deficiency impinges on Treg function. We embarked on a study on the influence of AIRE on the *in vitro* and *in vivo* suppressor activity of CD8<sup>+</sup>CD28<sup>low</sup> Treg. Mice carrying a 13bp mutation in the AIRE-gene that disrupts the PHD1 domain in exon 8 were previously published (21). It was demonstrated that these mice developed mild symptoms of autoimmune-pathology, similar to other AIRE-deficient mice on the C57BL/6 background. Given that CD28 is downmodulated on chronically activated T lymphocytes (39), we first compared the numbers and phenotypes of CD8<sup>+</sup>CD28<sup>low</sup> splenic T cells from AIRE<sup>o</sup> C57BL/6 mice and their wt (AIRE<sup>+/+</sup>) littermates (Fig. 1). “CD28<sup>low</sup>” cells were defined as those expressing levels not exceeding the level found with an isotype-matched control antibody (Fig. 1A)(15). AIRE<sup>o</sup> and wt mice had similar percentages and absolute numbers of CD8<sup>+</sup>CD28<sup>low</sup> cells in the spleen (Fig. 1B). As shown in Fig. 1C, these cells expressed neither the early activation marker CD69 nor the IL-2R $\alpha$  chain CD25, also upregulated upon T-cell activation. Moreover, they expressed low levels of the activation marker CD44 and high levels of naïve T cell-marker CD45RB. The lymph-node homing-receptor L-selectin (CD62L) was expressed at high levels on both wt and AIRE<sup>o</sup> CD8<sup>+</sup>CD28<sup>low</sup> splenic T cells. Wt and AIRE<sup>o</sup> CD8<sup>+</sup>CD28<sup>low</sup> cells uniformly expressed high levels of TCR. Combined, these data show that wt as well as AIRE<sup>o</sup> CD8<sup>+</sup>CD28<sup>low</sup> T cells had a naïve phenotype. The integrin  $\alpha_E$  chain CD103 is expressed on the majority of CD8<sup>+</sup>CD28<sup>low</sup> T cells and, again, no difference between wt and AIRE<sup>o</sup> cells was

observed. The IL-2R $\beta$  chain CD122 is expressed at hardly detectable levels on wt and AIRE $^{\circ}$  CD8 $^{+}$ CD28 $^{\text{low}}$  cells (Fig. 1C), indicating that they constitute a population distinct from CD122 $^{\text{high}}$  CD8 $^{+}$  regulatory cells (40) that have a CD28 $^{+}$  phenotype (Fig. S1A). In contrast to the uniform naïve phenotype of CD8 $^{+}$ CD28 $^{\text{low}}$  splenic cells, the CD8 $^{+}$ CD28 $^{+}$  population, which at the population-level lacks *in vitro* and *in vivo* regulatory capacity (15), contains activated (CD44 $^{\text{high}}$ ) cells. However, again no phenotypic difference between wt and AIRE $^{\circ}$  CD8 $^{+}$ CD28 $^{+}$  T cells was observed (Fig. S1A).

We next analyzed the gene-expression profiles of wt *vs.* AIRE $^{\circ}$  CD8 $^{+}$ CD28 $^{\text{low}}$  Treg (Figs. 1D, S1B, C). RNA was extracted from freshly isolated and from *in vitro* activated cells and genome-wide gene expression profiling was performed. Microarray data showed distinct grouping of the freshly isolated *vs.* activated samples (Figs. 1D, S1B), but no subgrouping was observed between the wt *vs.* AIRE $^{\circ}$  samples within these activation states. Analysis of variance (ANOVA) revealed 2190 genes with differential average expression between resting *vs.* activated cells (adjusted *p*-value < 0.05 and absolute fold-change  $\geq$  2) (Fig. 1D), but did not reveal any genes with significant differential average expression between AIRE $^{\circ}$  and wt cells with adjusted *p*-values approaching 1 for both the activated and native AIRE $^{\circ}$  *vs.* wt contrasts (Fig. S1C). Together, these data show that unaltered numbers of transcriptionally and phenotypically normal CD8 $^{+}$ CD28 $^{\text{low}}$  Treg develop in AIRE $^{\circ}$  mice.

*The TCR repertoires of wt and AIRE<sup>o</sup> CD8<sup>+</sup>CD28<sup>low</sup> Treg are very similar but not identical*

AIRE drives ectopic expression of tissue antigens by mTEC, including that of the XCL-1 chemokine involved in accumulation of thymic dendritic cells in the medulla (32, 41). Since the thymic medulla and dendritic cells play a central role in shaping of the T cell-repertoire, the repertoires of wt vs. AIRE<sup>o</sup> CD8<sup>+</sup>CD28<sup>low</sup> Treg may be different. To assess this possibility, we analyzed the TCR-repertoire of peripheral CD8<sup>+</sup>CD28<sup>low</sup> Treg. We found that TCR V $\alpha$  and V $\beta$  usage was very diverse, but it was indistinguishable between wt vs. AIRE<sup>o</sup> Treg (Fig. 1E). Moreover, immunoscope analysis of all V $\alpha$  and V $\beta$  domains revealed similar near-normal distributions of CDR3 lengths in wt vs. AIRE<sup>o</sup> CD8<sup>+</sup>CD28<sup>low</sup> Treg (Figs. 1F and S1D, E). However, a reproducible increase in the signal of 9 amino acid long V $\alpha$ 12 CDR3 was observed in AIRE<sup>o</sup> as compared to wt CD8<sup>+</sup>CD28<sup>low</sup> Treg (Figs. 1F and S1D). Together, these data show that the CD8<sup>+</sup>CD28<sup>low</sup> TCR repertoire is very diverse and similar between wt and AIRE<sup>o</sup> mice, but also clearly indicate that they are not identical.

*CD8<sup>+</sup>CD28<sup>low</sup> Treg from AIRE-deficient mice exert normal in vitro suppressive activity*

We next compared the *in vitro* suppressive capacities of wt vs. AIRE<sup>o</sup> CD8<sup>+</sup>CD28<sup>low</sup> Treg. It was previously shown that freshly isolated CD8<sup>+</sup>CD28<sup>low</sup> cells exert *in vitro* and *in vivo* suppressive activity (14, 15). Titrated numbers of magnetic bead sorted Treg were therefore put in culture with CFSE-labeled responder CD4<sup>+</sup> T cells. T-cell stimulation was achieved using APC and anti-CD3 antibody. Proliferation of and IFN- $\gamma$  production by the CD4<sup>+</sup> responder T cells was as efficiently suppressed by AIRE<sup>o</sup> as by wt CD8<sup>+</sup>CD28<sup>low</sup> Treg (Figs. 2A, B). Also when stimulated with



allogeneic APC, proliferation was as efficiently inhibited by AIRE<sup>o</sup> as by wt Treg (Fig. 2C). Prestimulation of Treg substantially increases their *in vitro* suppressive activity. We therefore assessed if wt and AIRE<sup>o</sup> CD8<sup>+</sup>CD28<sup>low</sup> Treg increased their *in vitro* suppressive activity to the same extent. Magnetic bead sorted splenic Treg were expanded *in vitro* with allogeneic APC for one week and then used in our *in vitro* suppression assays (Fig. S2). Upon *in vitro* stimulation with APC and anti-CD3 antibody, thus activated wt and AIRE<sup>o</sup> CD8<sup>+</sup>CD28<sup>low</sup> Treg equally efficiently inhibited proliferation and IFN- $\gamma$  production by conventional CD4<sup>+</sup> T cells (Figs. S2A, B). Also in mixed lymphocyte cultures, preactivated wt and AIRE<sup>o</sup> Treg inhibited proliferation with equal efficiency (Fig. S2C). In all three cases, prestimulation substantially increased suppressive activity (cf. Figs. 2A, B, C and Figs S2A, B, C, respectively).

IL10-deficient CD8<sup>+</sup>CD28<sup>low</sup> Treg less efficiently suppress *in vitro* T cell-activation than wt cells (15). Together with our observation that wt and AIRE<sup>o</sup> CD8<sup>+</sup>CD28<sup>low</sup> Treg have identical *in vitro* suppressive capacity, this suggests that IL-10 production by wt and AIRE<sup>o</sup> Treg is probably similar. To verify this hypothesis, we stimulated freshly isolated wt and AIRE<sup>o</sup> Treg with anti-CD3 antibody and APC. Five days later, the frequency of IL-10 producing cells was assessed by flow-cytometry. We observed that a similar proportion of wt and AIRE<sup>o</sup> Treg produced this central anti-inflammatory cytokine (Fig. 2D). Secretion of IL-10 by *in vitro* activated wt and AIRE<sup>o</sup> Treg was assessed by ELISA and, again, was found to be similar (Fig 2E). Combined, these data show that AIRE-deficiency does not perturb *in vitro* suppressor-function of and IL-10 production by CD8<sup>+</sup>CD28<sup>low</sup> Treg.

*AIRE-deficient CD8<sup>+</sup>CD28<sup>low</sup> Treg are incapable of preventing experimental colitis*

We previously published that CD8<sup>+</sup>CD28<sup>low</sup> Treg prevented experimental IBD in mice (15). To study the *in vivo* function of AIRE<sup>o</sup> Treg, we therefore assessed if they were capable of preventing this pathology. Immuno-compromised RAG-2 deficient (RAG<sup>o</sup>) mice were injected with syngeneic flow-sorted naïve CD4<sup>+</sup>CD45RB<sup>high</sup> cells. These mice developed weight-loss and histological signs of colitis such as substantial mucosal thickening, disappearance of goblet cells, elongation of crypts, and infiltration by mononuclear cells (Figs. 3A, B). When the colitogenic population was co-injected with syngeneic wt CD8<sup>+</sup>CD28<sup>low</sup> cells, weight-loss and histological signs of colitis were prevented, confirming our previously published data (Fig. 3A, B, C). In contrast, co-administration of AIRE<sup>o</sup> CD8<sup>+</sup>CD28<sup>low</sup> Treg did not prevent intestinal pathology (Figs. 3A, B). The clinical scores of colons from mice injected with colitogenic cells and AIRE<sup>o</sup> CD8<sup>+</sup>CD28<sup>low</sup> Treg were as severe as those from mice injected with colitogenic T cells alone (Fig. 3C). Injection of AIRE<sup>o</sup> CD8<sup>+</sup>CD28<sup>low</sup> cells alone did not induce any signs of colitis, excluding the hypothetical possibility that this population contains colitogenic cells that cannot be suppressed by CD8<sup>+</sup>CD28<sup>low</sup> Treg (Fig. S3).

It was previously reported that AIRE<sup>o</sup> CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup> Treg prevented experimental colitis (30), and our results were therefore rather surprising. However, the AIRE-deficient mice we used did not carry the same mutation as the mice used by Anderson and colleagues. Moreover, the experimental setup was not strictly identical to ours. We therefore assessed if CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup> Treg from our AIRE<sup>o</sup> animals could prevent colitis induced by injection of CD4<sup>+</sup>CD45RB<sup>high</sup> cells. Mice injected with colitogenic T cells developed weight-loss and histological signs of colitis such as substantial mucosal thickening, disappearance of goblet cells, elongation of crypts, and

infiltration by mononuclear cells (Figs. 4A, B). In contrast, mice co-injected with  $CD4^+CD25^{high}$  Treg from wt but also from AIRE<sup>o</sup> animals showed substantially reduced signs of pathology (Figs. 4A, B). Clinical scores attributed to the histological analysis of all experimental mice confirmed that both wt and mutant  $CD4^+CD25^{high}$  Treg populations efficiently prevented development of intestinal pathology (Fig. 4C). The here described incapacity of AIRE<sup>o</sup> Treg to prevent experimental colitis therefore appears to be a specific property of the  $CD8^+CD28^{low}$  population.

## Discussion

In this report, we show that AIRE-deficiency leads to a defect of the *in vivo* function of a Treg population that appears to play an important role in maintenance of immunological homeostasis in the intestines. Since the *in vitro* suppressor activity and IL-10 production of wt *vs.* AIRE<sup>o</sup> CD8<sup>+</sup>CD28<sup>low</sup> Treg were strictly identical, and no difference could be detected in phenotype nor in transcriptional pattern, we feel that the identified defect is most likely due to very subtly altered shaping of the CD8<sup>+</sup>CD28<sup>low</sup> Treg TCR-repertoire by intrathymic or peripheral mechanisms. This hypothesis is supported by careful analysis of V $\alpha$  and V $\beta$  CDR3s which showed that the TCR-repertoires of wt *vs.* AIRE<sup>o</sup> CD8<sup>+</sup>CD28<sup>low</sup> Treg are diverse and very similar, but also revealed that they are not identical.

To date, no other evidence has been published showing that AIRE-deficiency leads to impaired *in vivo* Treg function. In nude mice transplanted with a wt and an AIRE<sup>o</sup> thymus, an autoimmune attack of several organs occurred. This result showed that the autoimmune syndrome developing in AIRE<sup>o</sup> mice was not due to defective dominant (i.e. Treg-mediated) tolerance. Moreover, CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup> Treg from these mice were as effective as wt Treg in preventing experimental colitis (30). On the other hand, transgenic expression of model antigens expressed under control of the AIRE-promoter enhanced development of CD4<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> Treg expressing specific transgenic TCR (42). Whereas the latter observation strongly suggested that proteins expressed under control of AIRE can modulate Treg repertoire selection, it failed to show that AIRE-deficiency leads to altered *in vivo* Treg function. In contrast, we here identified an *in vivo* functional defect of the CD8<sup>+</sup>CD28<sup>low</sup> Treg population from AIRE<sup>o</sup> mice.

Expression of AIRE in T-lymphocytes has never been found, and it appears therefore unlikely that this transcription factor intrinsically affects CD8<sup>+</sup>CD28<sup>low</sup> Treg function. This postulate is supported by the indistinguishable transcriptional patterns we found in wt vs. AIRE<sup>o</sup> CD8<sup>+</sup>CD28<sup>low</sup> Treg. In *in vitro* experiments, we found that freshly isolated wt and AIRE<sup>o</sup> Treg equally well inhibited proliferation and IFN- $\gamma$  production by conventional T cells. IL-10 deficient CD8<sup>+</sup>CD28<sup>low</sup> Treg were incapable of preventing experimental colitis, which showed that this cytokine plays a non-redundant role *in vivo* (15). We therefore also assessed production of this cytokine and found that, upon a one-week activation period *in vitro*, CD8<sup>+</sup>CD28<sup>low</sup> Treg from wt and AIRE<sup>o</sup> mice similarly produced and secreted IL-10. Moreover, the substantially increased *in vitro* suppressor activity of wt Treg upon *in vitro* prestimulation was also found (and to the same extent) for AIRE<sup>o</sup> CD8<sup>+</sup>CD28<sup>low</sup> cells. Increased suppressor activity of Treg upon *in vitro* activation probably reflects differentiation of naïve Treg to effector cells, a process known to take several days for conventional T cells (43). Combined, these data establish that the intrinsic suppressive capacity of the AIRE<sup>o</sup> CD8<sup>+</sup>CD28<sup>low</sup> Treg population is unaltered. This was an important point to make since it was previously shown that the CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> Treg population of autoimmune-diabetes prone NOD mice is contaminated with substantial number of cells not expressing Foxp3. This observation probably accounts for the observed reduced *in vitro* and *in vivo* regulatory capacity of NOD CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T cells (44).

It appears therefore more likely that AIRE somehow affects shaping of the TCR-repertoire of CD8<sup>+</sup>CD28<sup>low</sup> Treg. Extensive analysis of the TCR V $\alpha$  and V $\beta$  usage and CDR3 length-distribution showed that the TCR repertoires of wt and AIRE<sup>o</sup> CD8<sup>+</sup>CD28<sup>low</sup> Treg are very diverse and very similar. This result parallels the finding

of apparently similar TCR-repertoires of wt vs. AIRE<sup>o</sup> CD4<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> Treg (33). However, using immunoscope analysis a very reproducible difference was observed, showing that the TCR-repertoires of CD8<sup>+</sup>CD28<sup>low</sup> cells from wt vs. AIRE<sup>o</sup> mice are not identical. Substantial more work will need to be done to precisely characterize the difference between the TCR-repertoires of CD8<sup>+</sup>CD28<sup>low</sup> Treg from wt and AIRE<sup>o</sup> mice and to identify the specificities involved in prevention of colitis, apparently lacking in AIRE<sup>o</sup> mice.

AIRE is expressed in the thymic medulla where it controls expression of tissue-restricted antigens (25, 26). Also lymph node stromal cells have been reported to express AIRE, to transcribe a distinct subset of genes encoding tissue-restricted antigens, and to induce peripheral tolerance (45-49). We have found mature CD8<sup>+</sup>CD28<sup>low</sup> T cells in the thymus, suggesting that they may develop in this primary lymphoid organ (Fig. S4). However, the CD28<sup>low</sup> phenotype of these Treg suggests a chronically activate state and they may therefore also differentiate in the periphery (39). Hence, identification of the site of CD8<sup>+</sup>CD28<sup>low</sup> Treg development merits further investigation. We propose that within this site AIRE allows stromal cells to express tissue-restricted antigens that play an important role in selection of the CD8<sup>+</sup>CD28<sup>low</sup> Treg repertoire. In absence of AIRE, a Treg repertoire would develop that is no longer capable of preventing experimental colitis.

Whereas AIRE<sup>o</sup> CD8<sup>+</sup>CD28<sup>low</sup> Treg failed to control experimental colitis, CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup> Treg from the same donors fully prevented the pathology, confirming a previous report (30). This difference suggests that the repertoire of CD8<sup>+</sup>CD28<sup>low</sup> Treg involved in prevention of colitis is very limited. The observation that AIRE<sup>o</sup> CD8<sup>+</sup>CD28<sup>low</sup> Treg fail to control colitis also suggests that these cells recognize self-

antigens. Our experimental model may therefore provide an ideal tool to evaluate the intriguing question of the antigen-specificity of colitis-preventing Treg.

The observation that  $CD8^+CD28^{low}$  Treg from AIRE<sup>o</sup> mice fail to control experimental colitis may provide an explanation for the gastrointestinal disorders observed in patients affected with the APECED syndrome (35). In contrast, AIRE<sup>o</sup> mice do not develop colitis. A tentative explanation for this observation is provided by the unaltered capacity of mouse AIRE<sup>o</sup>  $CD4^+CD25^+$  Treg to prevent intestinal inflammation. Human  $CD8^+$  T cells from healthy colon biopsies have *in vitro* suppressive activity. In contrast,  $CD8^+$  T cells from colon biopsies affected with inflammatory bowel disease (IBD) lack such *in vitro* suppressive activity (36). These results therefore suggest an important role for defective  $CD8^+$  Treg function in human IBD and may explain the difference between the effects of human and mouse AIRE-deficiency on chronic intestinal inflammation.

In conclusion, AIRE-deficient  $CD8^+CD28^{low}$  Treg fail to prevent experimental colitis. It will now be important to further characterize the mechanisms by which AIRE-deficiency perturbs the studied *in vivo* function of this Treg population and to identify the antigen(s) recognized.



## Materials and Methods

### *Mice*

All mice were used at 6 to 10 weeks of age. DBA/2 and C57BL/6 mice were from Janvier (Le Genest St Isle, France). RAG-2 deficient (RAG<sup>o</sup>) C57BL/6 mice were bred in our SPF animal facility. AIRE deficient C57BL/6 mice (21) were maintained in a heterozygous breeding colony, AIRE<sup>+/+</sup> littermates were used as controls. The health status of mice in the animal facility was periodically monitored according to FELASA guidelines and found free of monitored pathogens. The regional animal-experimentation ethics committee approved performed experiments (Reference number MP/01/39/10/06).

### *Flow cytometry analysis*

The following reagents were used: FITC-labeled anti-CD8 $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , CD103, and CD45RB; anti-CD4-PE; anti-CD4-APC, anti-IL10-APC; anti-CD28-biotin; streptavidin-PE, all from eBiosciences (San Diego, CA); anti-CD69-FITC, CD122-FITC; APC-conjugated anti-CD62L, CD25, TCR $\beta$ ; anti-CD44-PeCy5; anti-CD8 $\alpha$ -AF700, all from BD-Pharmingen (Heidelberg, Germany).

For FACS analysis, cells were incubated with antibodies in staining buffer (PBS and 2.5% FCS) for 20min and then washed. Labeled cells were analyzed on a FACS LSRII (BD) using DIVA (BD) and FlowJo software (Tree Star, ashland, OR).

### *Isolation of T-cell subsets*

CD8<sup>+</sup>CD28<sup>low</sup> Treg and CD4<sup>+</sup>CD45RB<sup>high</sup> colitogenic T cells were isolated as previously described (15). For isolation of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup> cells, erythrocyte-depleted

splenocytes were incubated with anti-FcγRII/III (2.4G2), anti-CD8 (53.6.7), anti-MHC class II (M5), and anti-B220 (RA3-6B2) and thus labeled cells eliminated using Dynabeads coated with sheep anti-rat IgG (Dyna biotech). The resulting population was labeled with anti-CD25-PE and CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup> cells enriched with anti-PE microbeads (Miltenyi). CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup> T cells were routinely > 95% pure. Responder CD4<sup>+</sup> T cells used in *in vitro* assays were enriched from erythrocyte-depleted splenocytes by Dynabead-mediated depletion of FcγRIII<sup>+</sup>, MHC class II<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup>, and B220<sup>+</sup> cells.

#### *Microarray analysis of Treg transcriptomes*

Total RNA was extracted using Trizol (Invitrogen, Carlsbad, USA) for lysis of cells and phase separation according to the manufacturer's instructions. RNA was then purified from the aqueous phase using the Qiagen RNeasy Mini Kit (Qiagen, Hilden, Germany). All RNA had a quality score (RNA integrity number) of at least 8.5, assessed using the Bioanalyser 2100 (Agilent Technologies, Santa Clara, CA). Genome-wide gene expression profiling was performed using the Affymetrix GeneChip® Mouse Gene 1.0 ST array. Labeling and array hybridization, washing, staining and scanning of the arrays were performed according to the manufacturer's instructions.

#### *Statistical analysis*

All analysis was performed using Partek® Genomics Suite™, Version 6.4 (Partek Incorporated, MO). The raw expression data were processed with the robust multi-chip average (RMA) function and quantile normalisation. These data were analyzed using ANOVA. A principal components analysis (PCA) plot of the expression data was constructed (Supplementary Methods). A heatmap of the upregulated and downregulated

genes (by fold change) comparing native and activated cells was generated using unsupervised clustering. An MA plot of the average expression of activated AIRE<sup>o</sup> vs. activated wt samples was generated.

#### *TCR-repertoire analyses*

RNA was extracted using the RNeasy Micro kit (QIAGEN) and reverse transcribed using oligo(dT) and SuperScript II (Invitrogen). V $\alpha$  and V $\beta$  expression pattern was assessed by real-time PCR using V-specific primers and probes (50, 51). Amplified products were used as template for a run-off reaction with fluorescent-tagged oligonucleotides. We have used the nomenclature from Arden *et al.* for the TCR $\beta$  chain (52), and the IMGT server referred to by Lefranc *et al.* for the TCR $\alpha$  chain (53).

#### *In vitro suppression assays*

CD4<sup>+</sup> responder (10<sup>5</sup>) and titrated numbers of CD8<sup>+</sup>CD28<sup>low</sup> Treg were cultured in presence of allogenic APC (5x10<sup>5</sup>) 96h and 1 $\mu$ Ci of <sup>3</sup>H-thymidine was added to the cultures for the last 16h. Alternatively, CD4<sup>+</sup> effector cells were stained *in vitro* with 5(6)-Carboxyfluorescein diacetate N-succinimidyl ester (CFSE, Sigma Aldrich). CFSE-labeled responders (10<sup>5</sup>) were cultured with titrated numbers of CD8<sup>+</sup>CD28<sup>low</sup> Treg in presence of APC (5x10<sup>5</sup>) and 10 $\mu$ g/ml anti CD3 $\epsilon$  mAb 2C11. After three days of culture, cells were stained with anti-CD4-APC and proliferation of CD4<sup>+</sup> responder cells was assessed by FACS.

#### *Detection of cytokine production*

Cells were re-stimulated with PMA (50ng/ml) and ionomycin (1µg/ml) (Sigma) for 4h at 37°C. For intracellular detection, Brefeldin A (10µg/ml, eBiosciences) was added for the last two hours, cells were stained for indicated surface-markers, fixed with 2% paraformaldehyde for 30min at 4°C, permeabilized in 0.5% saponin/1% BSA/1 µg/ml rat IgG in PBS for 30 min at RT, and then incubated for 30min at RT with FITC-conjugated anti IFN-γ or anti IL-10 in permeabilization buffer. IL-10 detection by ELISA was performed using JES-2AS and SXC-1 antibodies.

#### *Induction and clinical and histological assessment of colitis*

C57BL/6 RAG-2<sup>o</sup> mice were i.v. injected with 4x10<sup>5</sup> syngenic wt CD4<sup>+</sup>CD45RB<sup>high</sup> T cells with or without 2x10<sup>5</sup> syngenic wt or AIRE<sup>o</sup> CD8<sup>+</sup>CD28<sup>low</sup> or CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup> cells. Mice were weighed weekly and euthanized after six to eight weeks. Histological analysis of distal colon and determination of clinical scores were performed as previously described (15).

## Acknowledgements

The authors thank Drs. Lucette Pelletier, Jean-Charles Guéry and Christophe Viret for critical reading of the manuscript and the staffs of the animal, flow-cytometry, and histopathology facilities for excellent technical support. This work was financially supported by grants from the Association François Aupetit (2007, 2008), the Association pour la Recherche sur le Cancer (to CP), Fundação para a Ciência e a Tecnologia (fellowship # SFRH/BPD/72483/2010, to RV), the EuroThymaide consortium (contract # LSHB-CT-2003-503410), the National Health and Medical Research Council of Australia (171601, 461204, 257501, 264573 and 406700), the Swedish Society of Medicine SLS-96661, the Swedish Endocrine Society, and the Swedish Research Council 524-2010-6723 (to BAL).

## References

1. Hogquist KA, Baldwin TA, Jameson SC (2005) Central tolerance: learning self-control in the thymus. *Nat. Rev. Immunol.* 5:772-782.
2. van Meerwijk JPM, et al. (1997) Quantitative impact of thymic clonal deletion on the T cell repertoire. *J. Exp. Med.* 185:377-383.
3. Bouneaud C, Kourilsky P, Bousso P (2000) Impact of negative selection on the T cell repertoire reactive to a self-peptide: A large fraction of T cell clones escapes clonal deletion. *Immunity* 13:829-840.
4. Mueller DL (2010) Mechanisms maintaining peripheral tolerance. *Nat. Immunol.* 11:21-27.
5. Pomie C, Menager-Marcq I, van Meerwijk JP (2008) Murine CD8(+) regulatory T lymphocytes: The new era. *Hum. Immunol.* 69:708-714.
6. Sakaguchi S, Yamaguchi T, Nomura T, Ono M (2008) Regulatory T cells and immune tolerance. *Cell* 133:775-787.
7. Belkaid Y, Blank RB, Suffia I (2006) Natural regulatory T cells and parasites: a common quest for host homeostasis. *Immunol. Rev.* 212:287-300.
8. Aluvihare VR, Betz AG (2006) The role of regulatory T cells in alloantigen tolerance. *Immunol. Rev.* 212:330-343.
9. Izcue A, Coombes JL, Powrie F (2006) Regulatory T cells suppress systemic and mucosal immune activation to control intestinal inflammation. *Immunol. Rev.* 212:256-271.
10. Brusko TM, Putnam AL, Bluestone JA (2008) Human regulatory T cells: role in autoimmune disease and therapeutic opportunities. *Immunol. Rev.* 223:371-390.
11. Joffre O, et al. (2008) Prevention of acute and chronic allograft rejection with CD4+CD25+Foxp3+ regulatory T lymphocytes. *Nat. Med.* 14:88-92.
12. Tsang JY, et al. (2008) Conferring indirect allospecificity on CD4CD25 Tregs by TCR gene transfer favors transplantation tolerance in mice. *J. Clin. Invest.* 118:3619-3628.
13. Vlad G, Cortesini R, Suciu-Foca N (2008) CD8+ T suppressor cells and the ILT3 master switch. *Hum. Immunol.* 69:681-686.
14. Najafian N, et al. (2003) Regulatory functions of CD8+CD28- T cells in an autoimmune disease model. *J. Clin. Invest.* 112:1037-1048.
15. Ménager-Marcq I, Pomié P, Romagnoli P, van Meerwijk JPM (2006) CD8+CD28- regulatory T-lymphocytes prevent experimental inflammatory bowel disease in mice. *Gastroenterology* 131:1775-1785.
16. Nagamine K, et al. (1997) Positional cloning of the APECED gene. *Nat. Genet.* 17:393-398.
17. The Finnish-German APECED Consortium (1997) An autoimmune disease, APECED, caused by mutations in a novel gene featuring two PHD-type zinc-finger domains. *Nat. Genet.* 17:399-403.
18. Ramsey C, et al. (2002) Aire deficient mice develop multiple features of APECED phenotype and show altered immune response. *Hum Mol Genet* 11:397-409.
19. Anderson MS, et al. (2002) Projection of an Immunological Self-Shadow Within the Thymus by the Aire Protein. *Science* 298:1395-1401.

20. Kuroda N, et al. (2005) Development of autoimmunity against transcriptionally unrepressed target antigen in the thymus of Aire-deficient mice. *J. Immunol.* 174:1862-1870.
21. Hubert FX, et al. (2009) Aire-deficient C57BL/6 mice mimicking the common human 13-base pair deletion mutation present with only a mild autoimmune phenotype. *J. Immunol.* 182:3902-3918.
22. Pontynen N, et al. (2006) Aire deficient mice do not develop the same profile of tissue-specific autoantibodies as APECED patients. *J. Autoimmun.* 27:96-104.
23. Kisand K, et al. (2010) Chronic mucocutaneous candidiasis in APECED or thymoma patients correlates with autoimmunity to Th17-associated cytokines. *J. Exp. Med.* 207:299-308.
24. Puel A, et al. (2010) Autoantibodies against IL-17A, IL-17F, and IL-22 in patients with chronic mucocutaneous candidiasis and autoimmune polyendocrine syndrome type I. *J. Exp. Med.* 207:291-297.
25. Kyewski B, Klein L (2006) A central role for central tolerance. *Annu. Rev. Immunol.* 24:571-606.
26. Mathis D, Benoist C (2007) A decade of AIRE. *Nat. Rev. Immunol.* 7:645-650.
27. Gardner JM, Fletcher AL, Anderson MS, Turley SJ (2009) AIRE in the thymus and beyond. *Curr. Opin. Immunol.* 21:582-589.
28. Liston A, Lesage S, Wilson J, Peltonen L, Goodnow CC (2003) Aire regulates negative selection of organ-specific T cells. *Nat. Immunol.* 4:350-354.
29. Liston A, et al. (2004) Gene Dosage-limiting Role of Aire in Thymic Expression, Clonal Deletion, and Organ-specific Autoimmunity. *J. Exp. Med.* 200:1015-1026.
30. Anderson MS, et al. (2005) The cellular mechanism of AIRE control of T cell tolerance. *Immunity* 23:227-239.
31. Laan M, et al. (2009) Autoimmune regulator deficiency results in decreased expression of CCR4 and CCR7 ligands and in delayed migration of CD4<sup>+</sup> thymocytes. *J. Immunol.* 183:7682-7691.
32. Lei Y, et al. (2011) Aire-dependent production of XCL1 mediates medullary accumulation of thymic dendritic cells and contributes to regulatory T cell development. *J. Exp. Med.* 208:383-394.
33. Daniely D, Kern J, Cebula A, Ignatowicz L (2010) Diversity of TCRs on natural Foxp3<sup>+</sup> T cells in mice lacking Aire expression. *J. Immunol.* 184:6865-6873.
34. Kekalainen E, et al. (2007) A defect of regulatory T cells in patients with autoimmune polyendocrinopathy-candidiasis-ectodermal dystrophy. *J. Immunol.* 178:1208-1215.
35. Husebye ES, Perheentupa J, Rautemaa R, Kampe O (2009) Clinical manifestations and management of patients with autoimmune polyendocrine syndrome type I. *J Intern Med* 265:514-529.
36. Brimnes J, et al. (2005) Defects in CD8<sup>+</sup> regulatory T cells in the lamina propria of patients with inflammatory bowel disease. *J. Immunol.* 174:5814-5822.
37. Grdic D, Hornquist E, Kjerrulf M, Lycke NY (1998) Lack of local suppression in orally tolerant CD8-deficient mice reveals a critical regulatory role of CD8<sup>+</sup> T cells in the normal gut mucosa. *J. Immunol.* 160:754-762.



38. Poussier P, Ning T, Banerjee D, Julius M (2002) A unique subset of self-specific intrainestinal T cells maintains gut integrity. *J. Exp. Med.* 195:1491-1497.
39. Vallejo AN (2005) CD28 extinction in human T cells: altered functions and the program of T-cell senescence. *Immunol. Rev.* 205:158-169.
40. Suzuki H, Shi Z, Okuno Y, Isobe K (2008) Are CD8+CD122+ cells regulatory T cells or memory T cells? *Hum. Immunol.* 69:751-754.
41. Mathis D, Benoist C (2009) Aire. *Annu. Rev. Immunol.* 27:287-312.
42. Aschenbrenner K, et al. (2007) Selection of Foxp3(+) regulatory T cells specific for self antigen expressed and presented by Aire(+) medullary thymic epithelial cells. *Nat. Immunol.* 8:351-358.
43. Lanzavecchia A, Sallusto F (2000) Dynamics of T lymphocyte responses: intermediates, effectors, and memory cells. *Science* 290:92-97.
44. Mellanby RJ, Thomas D, Phillips JM, Cooke A (2007) Diabetes in non-obese diabetic mice is not associated with quantitative changes in CD4+ CD25+ Foxp3+ regulatory T cells. *Immunol.* 121:15-28.
45. Gardner JM, et al. (2008) Deletional tolerance mediated by extrathymic Aire-expressing cells. *Science* 321:843-847.
46. Lee JW, et al. (2007) Peripheral antigen display by lymph node stroma promotes T cell tolerance to intestinal self. *Nat. Immunol.* 8:181-190.
47. Nichols LA, et al. (2007) Deletional self-tolerance to a melanocyte/melanoma antigen derived from tyrosinase is mediated by a radio-resistant cell in peripheral and mesenteric lymph nodes. *J. Immunol.* 179:993-1003.
48. Cohen JN, et al. (2010) Lymph node-resident lymphatic endothelial cells mediate peripheral tolerance via Aire-independent direct antigen presentation. *J. Exp. Med.* 207:681-688.
49. Fletcher AL, et al. (2010) Lymph node fibroblastic reticular cells directly present peripheral tissue antigen under steady-state and inflammatory conditions. *J. Exp. Med.* 207:689-697.
50. Cabaniols JP, Fazilleau N, Casrouge A, Kourilsky P, Kanellopoulos JM (2001) Most alpha/beta T cell receptor diversity is due to terminal deoxynucleotidyl transferase. *J. Exp. Med.* 194:1385-1390.
51. Fazilleau N, et al. (2007) T cell repertoire diversity is required for relapses in myelin oligodendrocyte glycoprotein-induced experimental autoimmune encephalomyelitis. *J. Immunol.* 178:4865-4875.
52. Arden B, Clark SP, Kabelitz D, Mak TW (1995) Mouse T-cell receptor variable gene segment families. *Immunogen.* 42:501-530.
53. Lefranc MP (2003) IMGT, the international ImMunoGeneTics database. *Nucleic Acids Res* 31:307-310.

## Figure Legends

**Figure 1:** *AIRE*<sup>°</sup> and wt mice have normal numbers of transcriptionally and phenotypically unaltered CD8<sup>+</sup>CD28<sup>low</sup> Treg with similar but apparently distinct TCR repertoires. (A) Definition of wt (*AIRE*<sup>+/+</sup>) and *AIRE*<sup>°</sup> (*AIRE*<sup>°/°</sup>) C57BL/6 CD8<sup>+</sup>CD28<sup>low</sup> cells from spleen. Flow-cytometry was performed using indicated antibodies. (B) Wt and *AIRE*<sup>°</sup> littermates had similar percentages of splenic CD8<sup>+</sup>CD28<sup>low</sup> Treg (gated as in A). Indicated are mean values ± SD, n=3. (C) Phenotype of CD8<sup>+</sup>CD28<sup>low</sup> cells, electronically gated as shown in A. Expression profiles of markers indicated in the figure. Control (ctrl) stainings were performed using isotype-matched antibodies. Shown are typical results of three independently performed experiments. (D) Heatmap of the differently expressed genes (according to fold-change) in resting compared with activated, wt vs. *AIRE*<sup>°</sup> CD8<sup>+</sup>CD28<sup>low</sup> Treg. Genes with statistical differential average expression (adjusted *p*-value < 0.05 ) with a fold change >2 when comparing activated and native cells are represented in this heat map. Red indicates increased expression, blue indicates decreased expression. The dendrogram shows that wt and *AIRE*<sup>°</sup> (KO) samples are not clustering within the activated and native states. (E) Vα or Vβ segment usage of wt vs. *AIRE*<sup>°</sup> CD8<sup>+</sup>CD28<sup>low</sup> splenic Treg, as measured by semi-quantitative RT-PCR. Indicated are mean values ± SD (n=3 samples consisting of pooled cells from three mice). (F) CDR3 length-distribution of indicated variable domains. Shown are typical results for indicated Vα and Vβ CDR3s. “10” indicates a CDR3 length of 10 amino-acids, other peaks are separated by 3 nucleotides = 1 amino-acid. Immunoscope results for all Vα and Vβ CDR3s for all analyzed mice are shown in Fig. S2D, E. The arrow indicates the relatively increased signal for 9AA long Vα12 CDR3 in *AIRE*<sup>°</sup> Treg.

**Figure 2:** *AIRE*<sup>o</sup> and wt *CD8*<sup>+</sup>*CD28*<sup>low</sup> cells have identical activity in *in vitro* suppression assays and produce similar levels of IL-10. (A) *CD8*<sup>+</sup>*CD28*<sup>low</sup> Treg isolated from wt (*AIRE*<sup>+/+</sup>) and *AIRE*<sup>o</sup> (*AIRE*<sup>o/o</sup>) C57BL/6 (B6) mice were cultured with CFSE-labeled responder B6 *CD4*<sup>+</sup> T cells and APC in presence of anti-*CD3*ε antibody. Proliferation of *CD4*<sup>+</sup> cells was assessed by FACS analysis of CFSE-dilution. (B) As in A, but responder *CD4*<sup>+</sup> T cells were analyzed by flow-cytometry for IFN-γ production. (C) B6 *CD4*<sup>+</sup> T cells were cultured with DBA/2 APC in presence of B6 *AIRE*<sup>o</sup> or wt *CD8*<sup>+</sup>*CD28*<sup>low</sup> Treg (as indicated) at indicated Treg/*CD4* ratios. Proliferation in these MLR was assessed by measuring incorporation of <sup>3</sup>H-Thy. (D) *CD8*<sup>+</sup>*CD28*<sup>low</sup> Treg were activated *in vitro* with anti-*CD3*ε antibody and APC during 5 days and then intracellularly stained with antibody specific for IL-10 or with isotype matched control antibody (dotted line). (E) As in D, but supernatants of cultures were analyzed by ELISA for IL-10. The broken line indicates background value, determined in absence of anti-*CD3*ε antibody in the *in vitro* culture. In A-E, shown results are representative of those obtained in at least three independent experiments.

**Figure 3:** *AIRE*<sup>o</sup> *CD8*<sup>+</sup> *CD28*<sup>low</sup> T cells fail to prevent colitis. RAG-2<sup>o</sup> hosts were i.v. injected with syngeneic *CD4*<sup>+</sup> *CD45RB*<sup>high</sup> colitogenic T cells with or without indicated *CD8*<sup>+</sup> *CD28*<sup>low</sup> Treg population (“wt”, *AIRE*<sup>+/+</sup>; “*AIRE*<sup>o</sup>”, *AIRE*<sup>o/o</sup>). (A) Evolution of weight of animals. Shown is the mean weight ± SD as a percentage of weight at start of experiment (\**P*<0.05, \*\**P*<0.01, Mann-Whitney test; n=9 per group; three independent experiments). (B) Mice were euthanized six weeks after injection of T cells. Microscopic sections of distal colon were stained with hematoxylin and eosin and examined for histological signs of colitis. Shown results are representative of those obtained in the three independent experiments. (C) Colons of mice were examined as in (B) and clinical scores of colitis attributed (n=9 from three independent experiments).

**Figure 4:** *AIRE*<sup>o</sup> *CD4*<sup>+</sup> *CD25*<sup>high</sup> Treg do not show any defect in prevention of colitis. Colitis was induced as in Fig. 3. (A) Evolution of weight of animals. Shown is the mean weight ± SD as a percentage of weight at start of experiment (\**P*<0.05, \*\**P*<0.01, Mann-Whitney test; n=6 w/o Treg, n=8 with wt Treg, n=8 with *AIRE*<sup>o</sup> Treg; two independent experiments). (B) Mice were euthanized seven weeks after injection of T cells. Microscopic sections of distal colon were stained with hematoxylin and eosin and examined for histological signs of colitis. Shown results are representative of those obtained in two independent experiments. (C) Colons of mice were examined as in (B) and clinical scores of colitis attributed (n-values as indicated, two independent experiments).

## LEGENDS TO SUPPLEMENTARY FIGURES

**Figure S1:** *CD8<sup>+</sup>CD28<sup>+</sup> cells have identical phenotypes and CD8<sup>+</sup>CD28<sup>low</sup> cells have indistinguishable transcriptional patterns in AIRE<sup>o</sup> vs. wt mice. (A)* AIRE<sup>o</sup> and wt CD8<sup>+</sup>CD28<sup>+</sup> cells have identical phenotypes. Splenocytes from wt and AIRE<sup>o</sup> C57BL/6 mice were analyzed for expression of CD8 and CD28 by flow cytometry. CD8<sup>+</sup>CD28<sup>+</sup> cells were electronically gated as shown in upper panels and expression profiles of indicated markers depicted in lower panels. Control (ctrl) stainings were performed using isotype-matched control antibodies. Similar results were obtained in 3 independent experiments. **(B)** AIRE<sup>o</sup> and wt CD8<sup>+</sup>CD28<sup>low</sup> cells have indistinguishable transcriptional patterns. Principal components analysis plot of native and activated CD8<sup>+</sup>CD28<sup>low</sup> Treg from wt and AIRE<sup>o</sup> mice. The first principal component (PC#1) is shown on the x-axis and explains the maximum amount (36.5%) of variation in the gene expression data, in this case, activated vs. freshly isolated cells. The second principal component (PC#2) is shown on the y-axis and explains the second most amount of remaining variation in the gene expression data (26.9%), which is difficult to attribute to a known biological variable in this case as there are no obvious groups of cells. **(C)** MA plot for average gene expression in activated AIRE<sup>o</sup> vs. activated wt CD8<sup>+</sup>CD28<sup>low</sup> Treg. The log fold change for activated AIRE<sup>o</sup> vs. activated wt cells is depicted on the y-axis. These differences in average expression are not significant since adjusted p-values for all values are approaching 1 (>0.99). **(D, E)** Immunoscope analysis of V $\alpha$  (D) and V $\beta$  (E) CDR3 reveals very similar patterns but suggests subtle differences between wt (upper panels) and AIRE<sup>o</sup> (lower panels) CD8<sup>+</sup>CD28<sup>low</sup> Treg repertoires. CDR3 lengths of indicated V $\alpha$  and V $\beta$  segment containing TCR were analyzed as in Fig. 1F. The three superimposed plots

represent three independently isolated Treg samples, each consisting of pooled cells from three mice. Note that the V $\alpha$ 12 patterns of wt vs. AIRE<sup>o</sup> CD8<sup>+</sup>CD28<sup>low</sup> Treg are reproducibly different.

**Figure S2:** *In vitro* prestimulated AIRE<sup>o</sup> and wt CD8<sup>+</sup>CD28<sup>low</sup> cells have similarly increased *in vitro* regulatory capacity. (A) Wt and AIRE<sup>o</sup> C57BL/6 CD8<sup>+</sup>CD28<sup>low</sup> Treg were isolated as described in Materials and Methods-section and preactivated *in vitro* with DBA/2 APC. Isolated responder C57BL/6 CD4<sup>+</sup> T cells were CFSE-labeled and co-cultured with DBA/2 APC coated with an anti-CD3 $\epsilon$  antibody in presence of preactivated AIRE<sup>o</sup> (red lines) or wt (blue lines) CD8<sup>+</sup>CD28<sup>low</sup> Treg at indicated regulatory/responder T cell ratios. Proliferation of responder cells was assessed by FACS analysis of CFSE dilution on electronically gated CD4<sup>+</sup> cells. (B) As in (A), but non CFSE-labeled responder CD4<sup>+</sup> T cells were analyzed, by flow-cytometry, for IFN- $\gamma$  production. Shown results are representative of those obtained in three independent experiments. (C) Constant numbers of isolated C57BL/6 CD4<sup>+</sup> T cells were cultured with DBA/2 APC in presence of titrated numbers of C57BL/6 AIRE<sup>o</sup> (red lines) or wt (blue lines) CD8<sup>+</sup>CD28<sup>low</sup> Treg preactivated with DBA/2 APC. Proliferation in these MLR was assessed by measuring incorporation of <sup>3</sup>H-Thy. All results are representative of three independent experiments.

**Figure S3:** *AIRE*<sup>o</sup>  $CD8^{+}CD28^{low}$  T cells are not colitogenic. RAG-2<sup>o</sup> hosts were i.v. injected with indicated syngenic  $CD8^{+}CD28^{low}$  T cells. (A) Evolution of weight of animals. Shown is the mean weight of animals  $\pm$  SD, depicted as percentage of weight at start of experiment (n=5 for wt and n=6 for *AIRE*<sup>o</sup> cells; two independent experiments). (B) Mice were euthanized six weeks after injection of T cells. Microscopic sections of distal colon were stained with hematoxylin and eosin and examined for signs of colitis. Shown results are representative of those obtained in the two independently performed experiments. (C) Colons of mice were examined as in (B) and clinical scores of colitis attributed as described in Materials and Methods-section (n-values as indicated, two independent experiments).

**Figure S4:** *Mature*  $CD4^{+}CD8^{+}CD28^{low}$  cells are found in the thymus. Wt C57BL/6 thymocytes were analyzed by flow cytometry for expression of CD4, CD8, TCR $\beta$ , and CD28. Mature  $CD4^{+}CD8^{+}$  single positive cells were electronically gated using indicated gate (upper panel) and expression of TCR vs. CD28 depicted (lower panel).



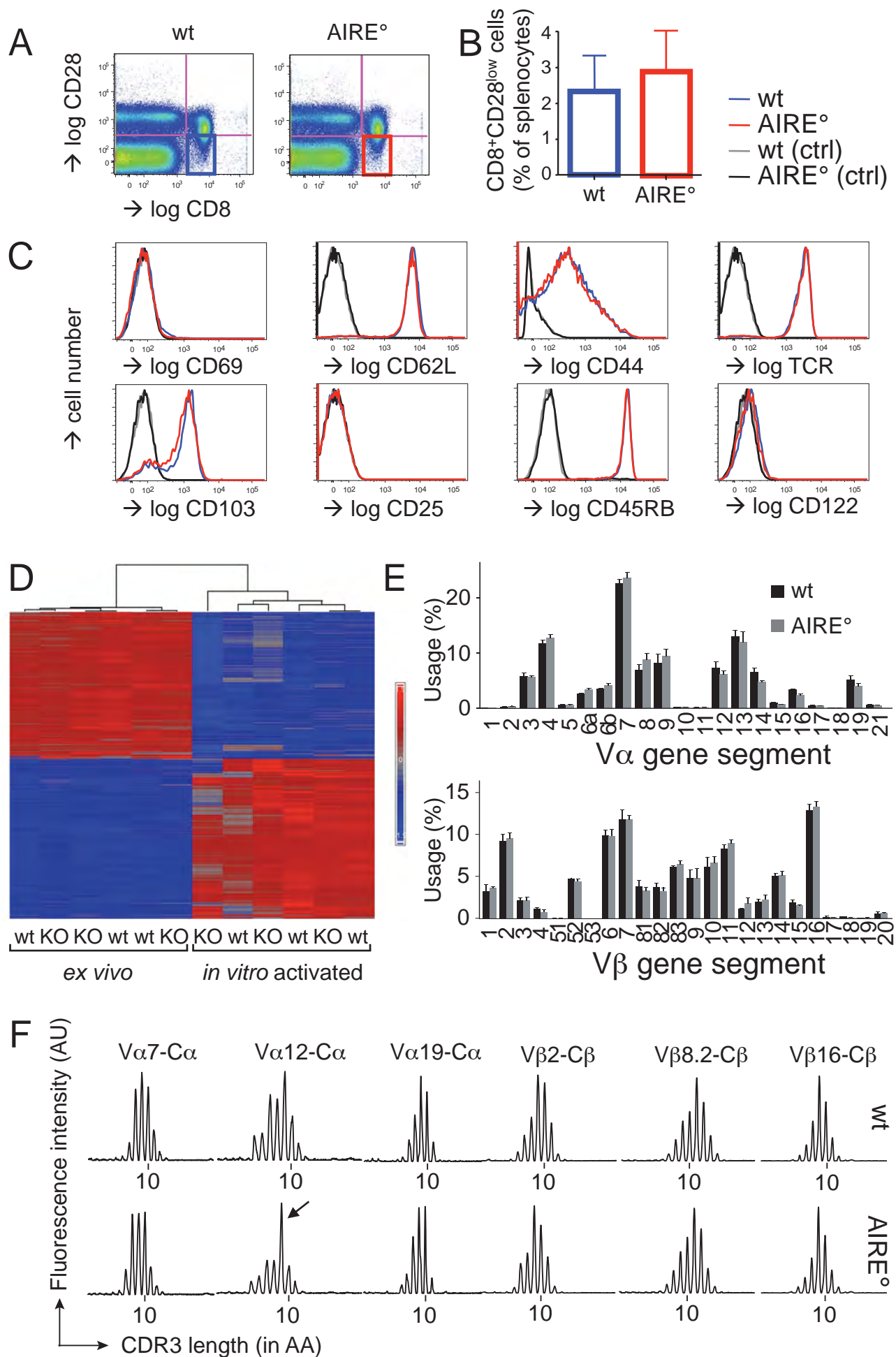


Figure 1

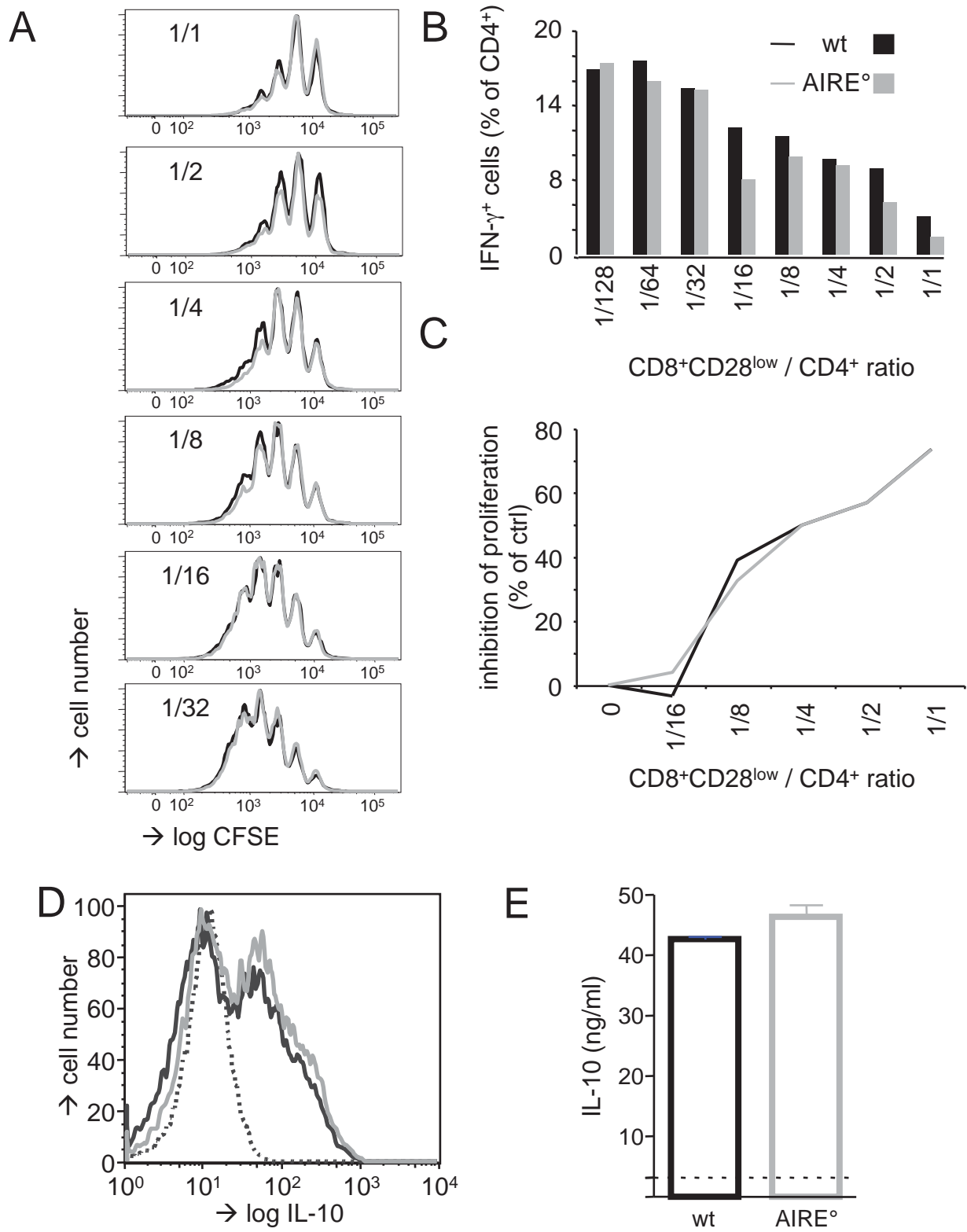


Figure 2

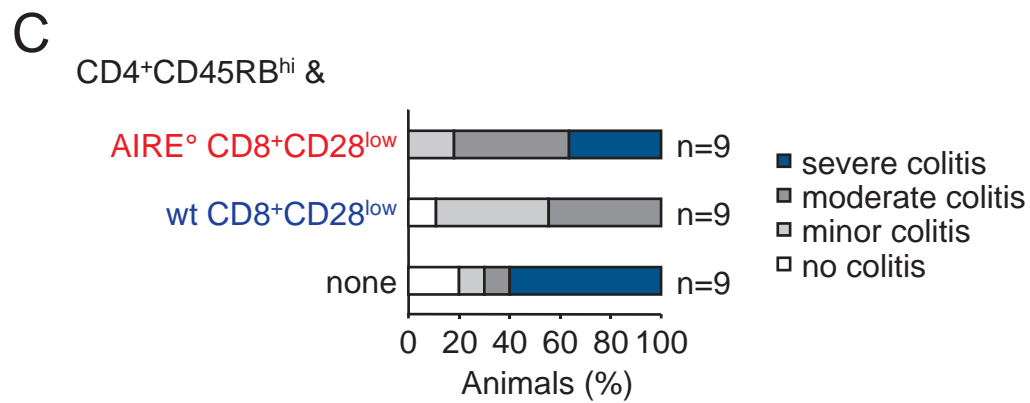
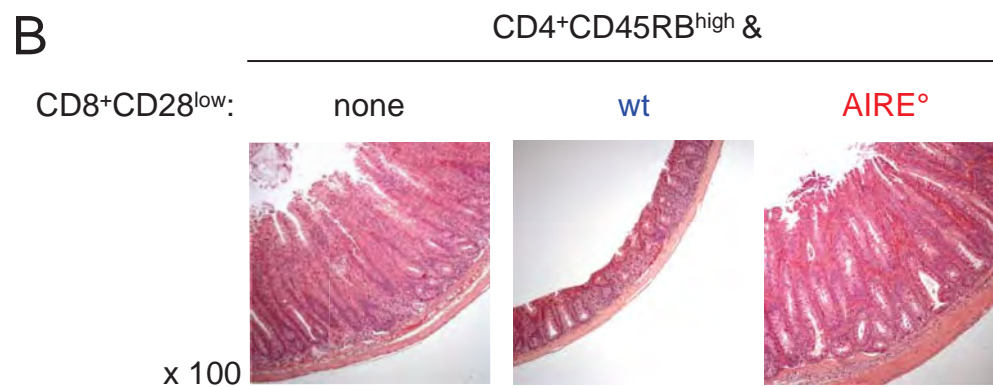
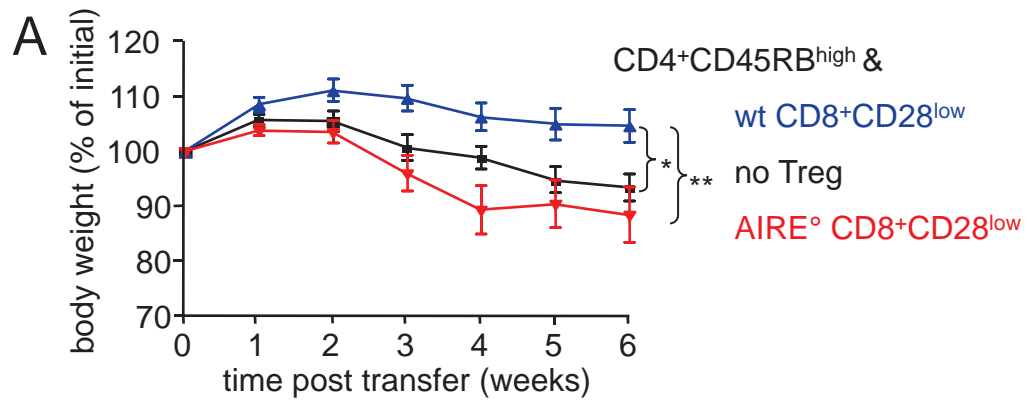


Figure 3

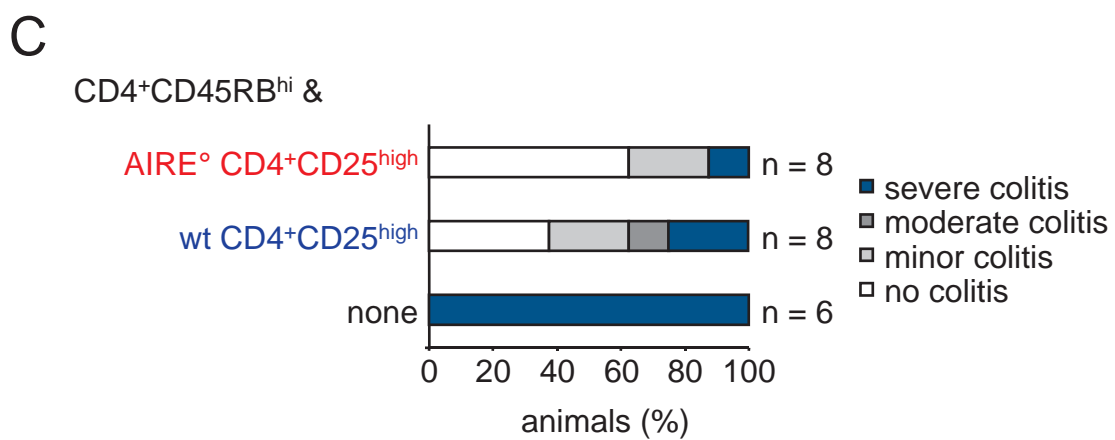
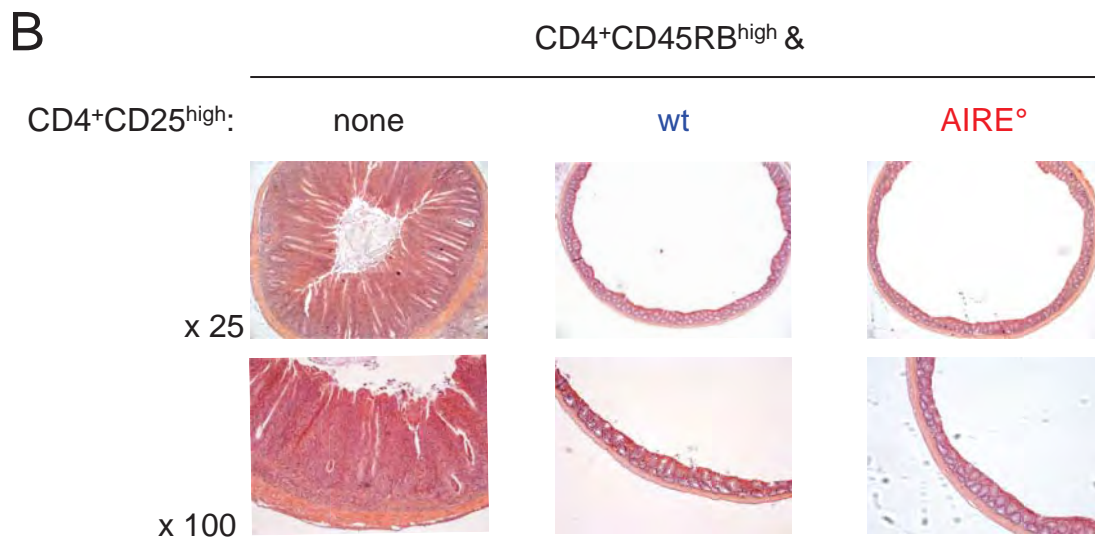
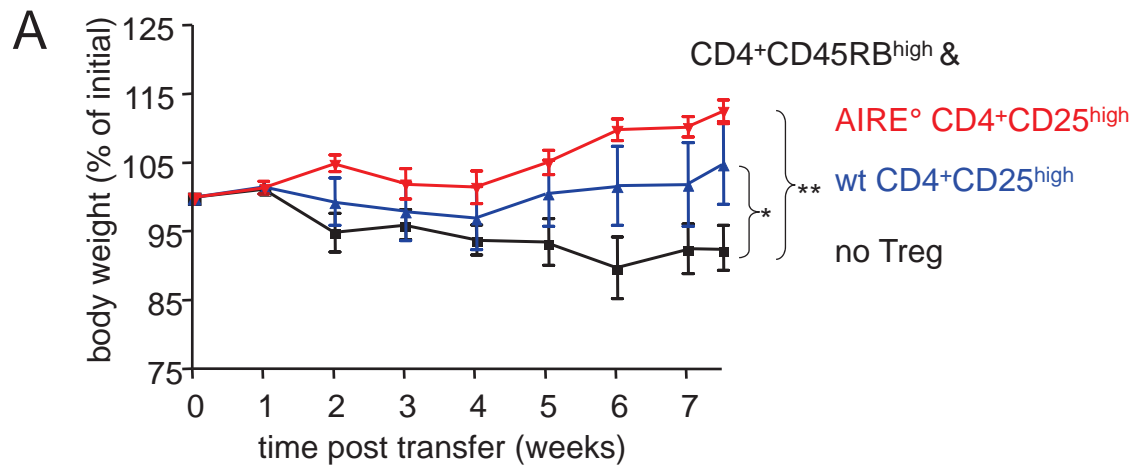


Figure 4

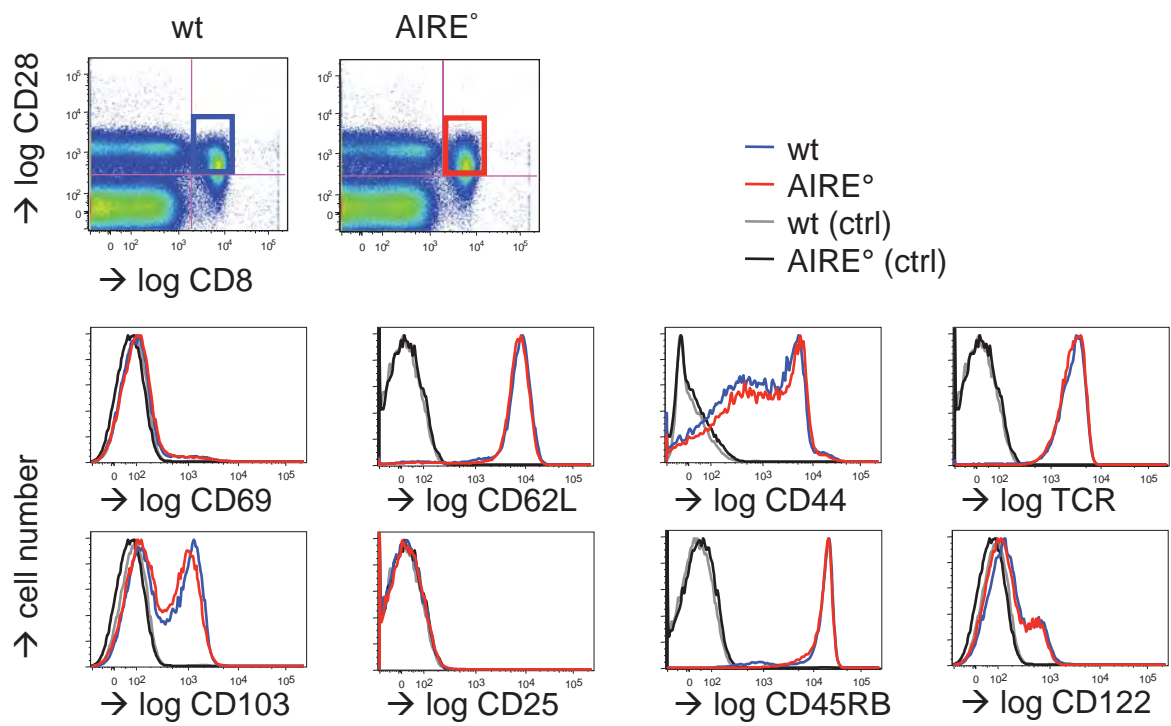


Figure S1A

PCA Mapping (63.4%)

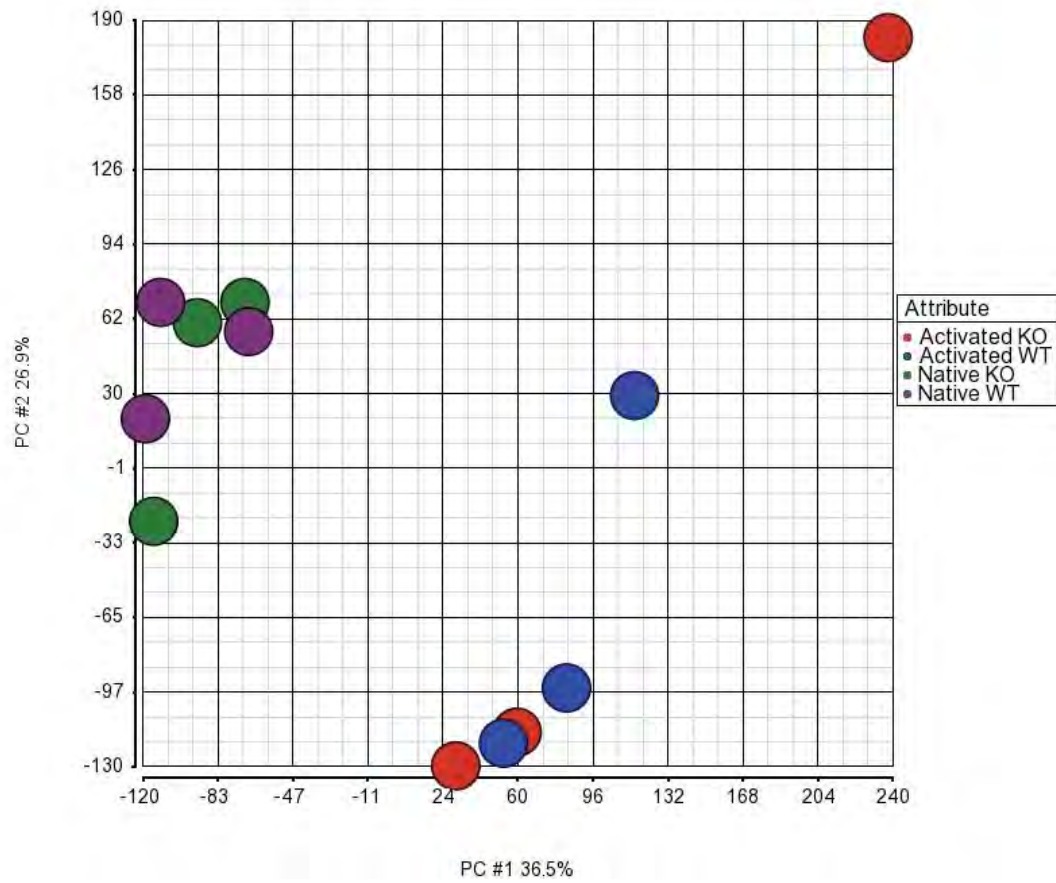


Figure S1B

MA Plot of 1/ANOVA-2way

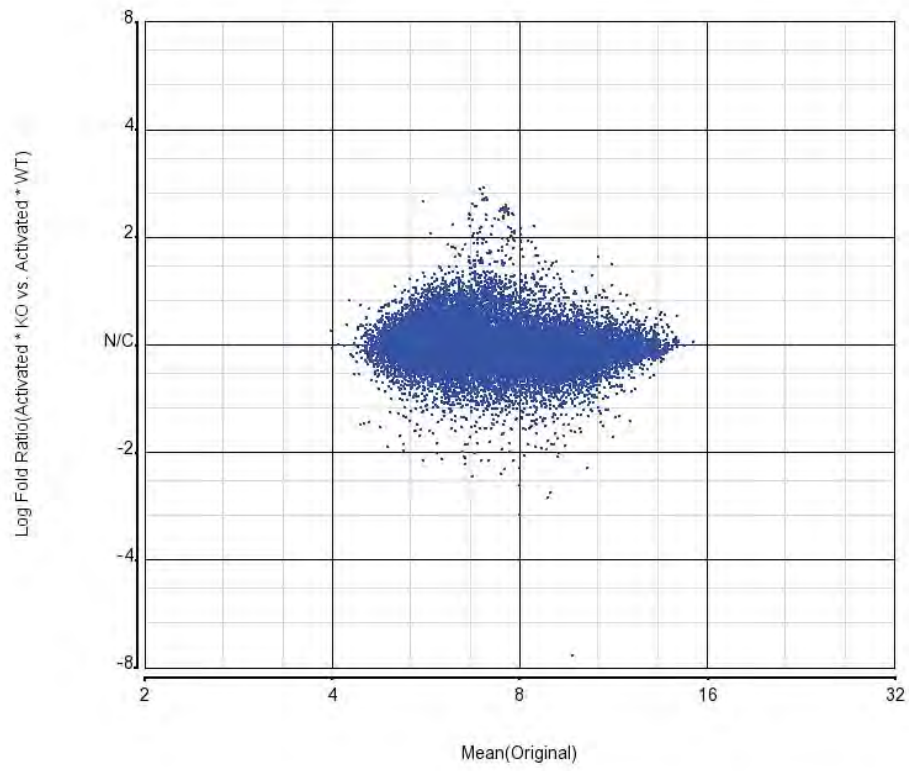


Figure S1C



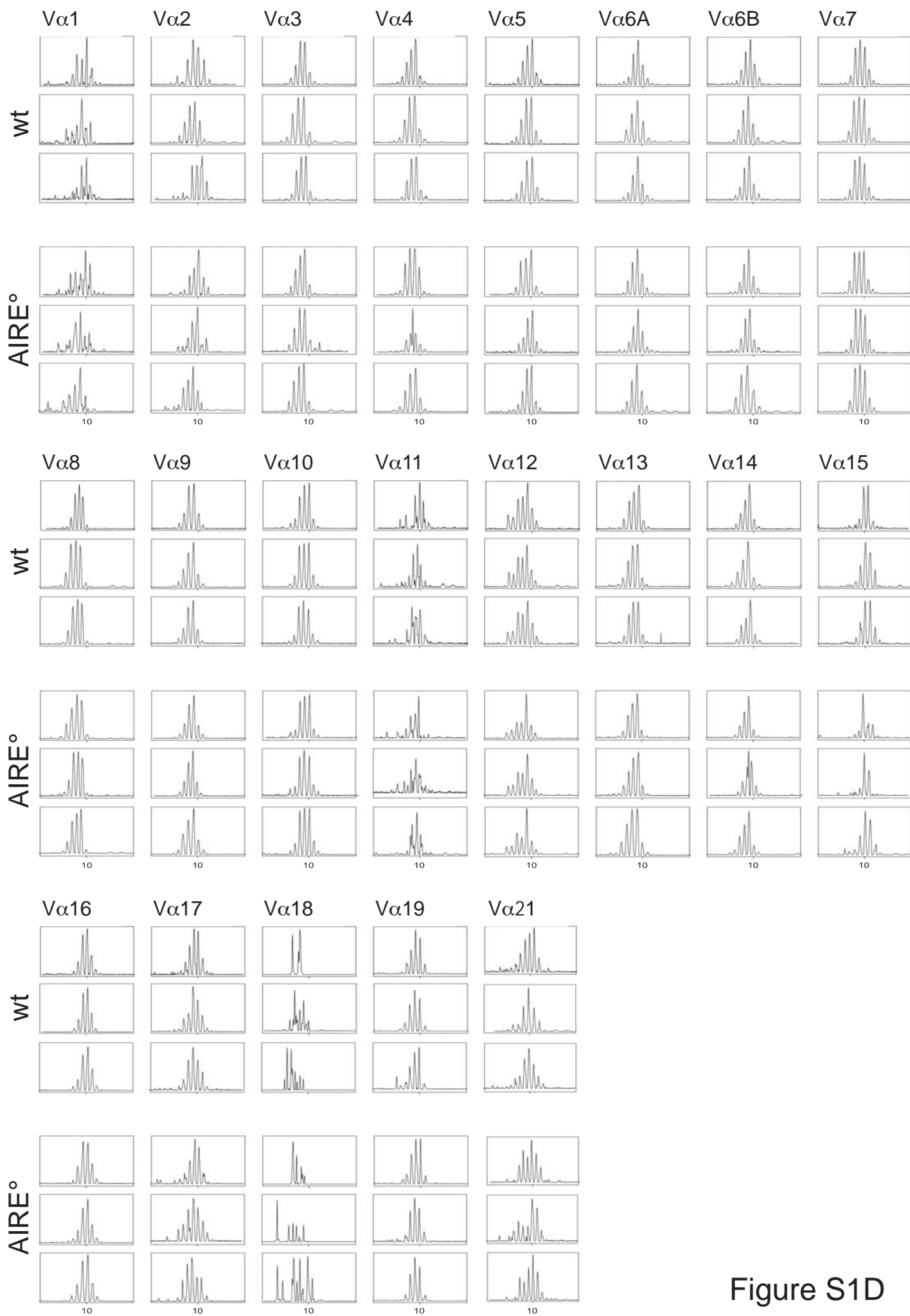


Figure S1D

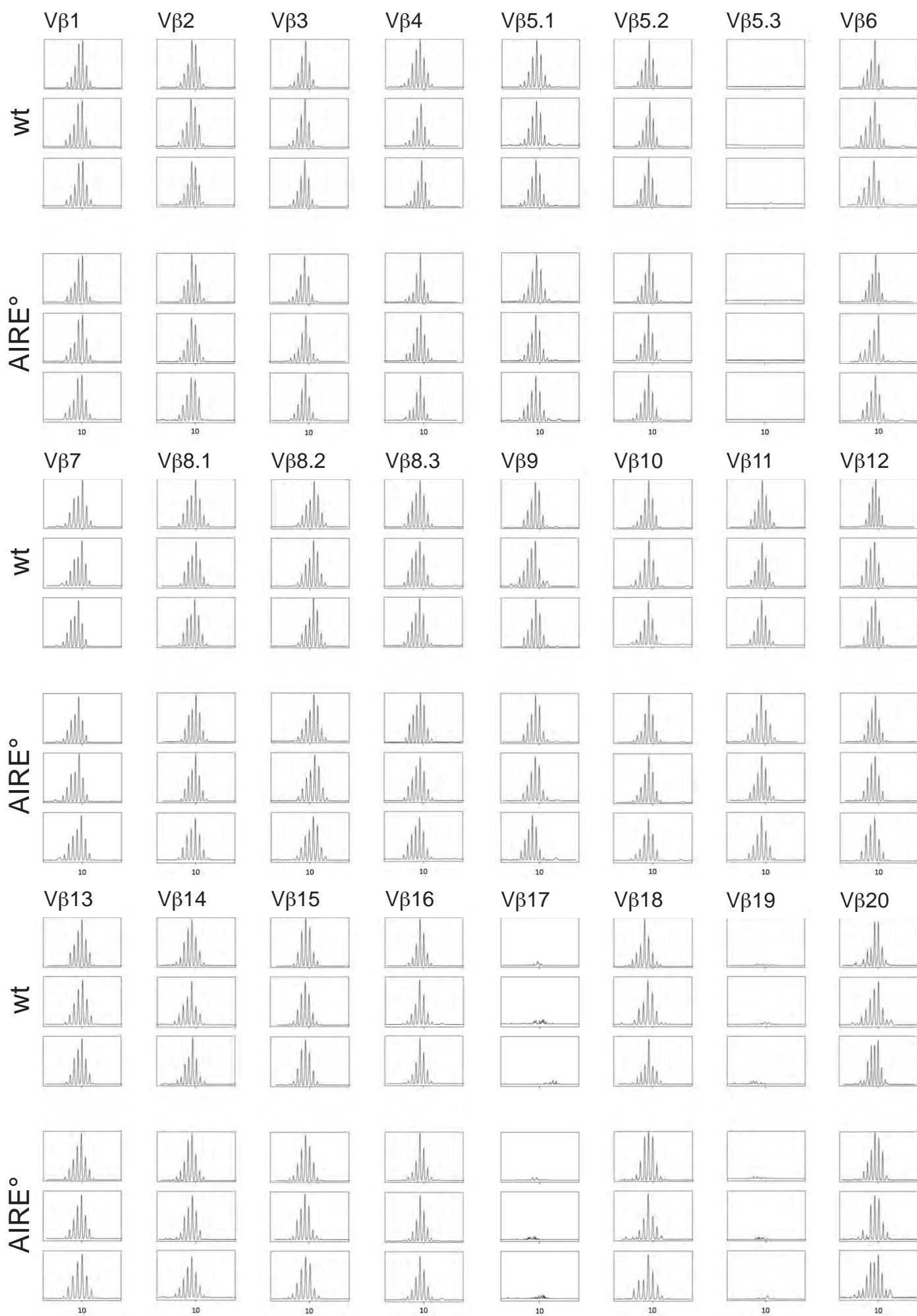


Figure S1E

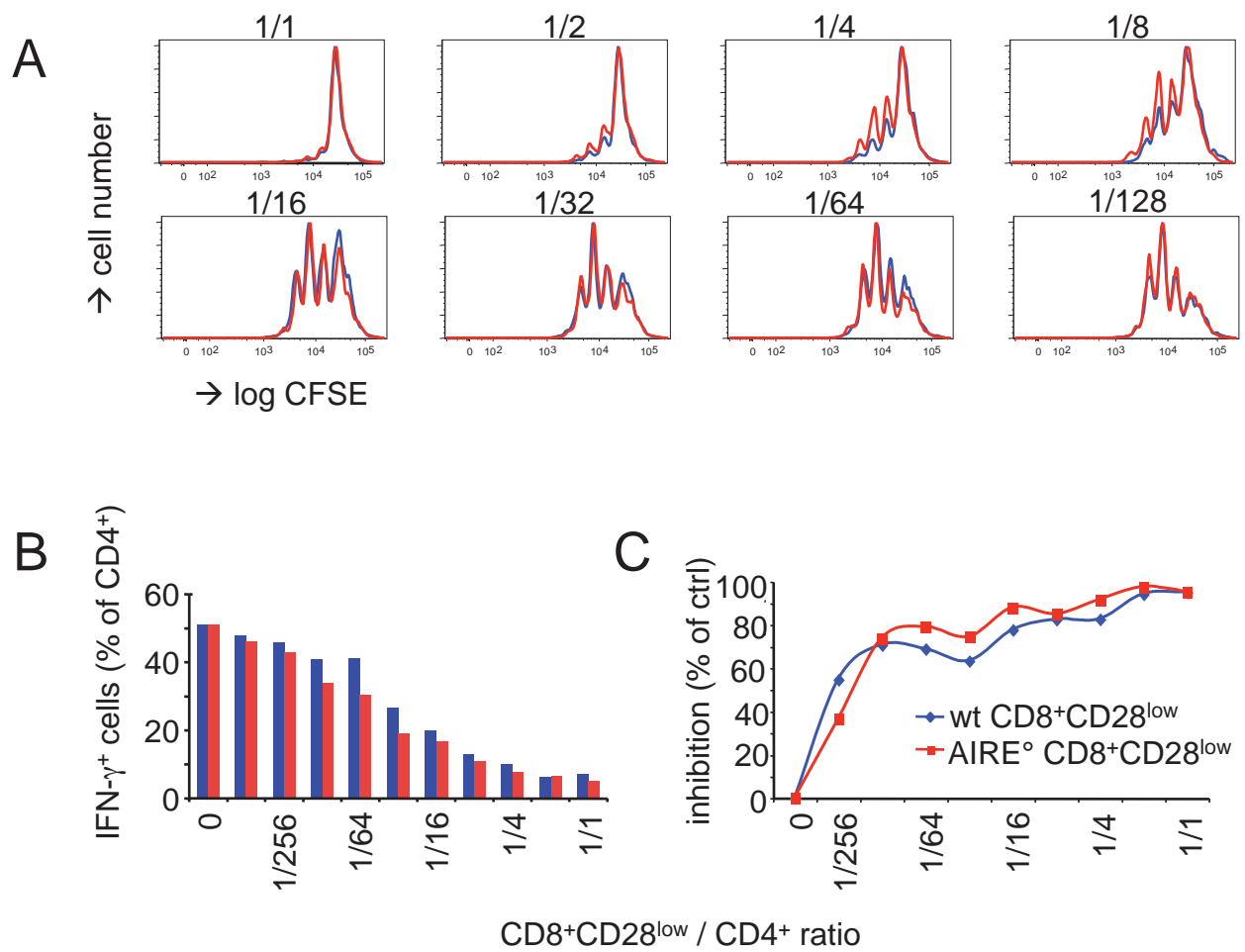


Figure S2

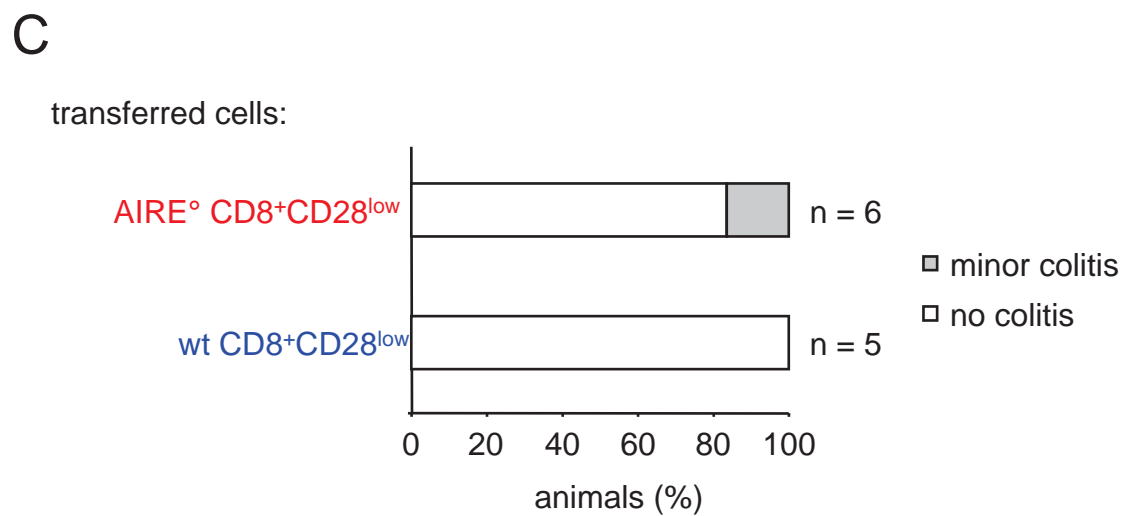
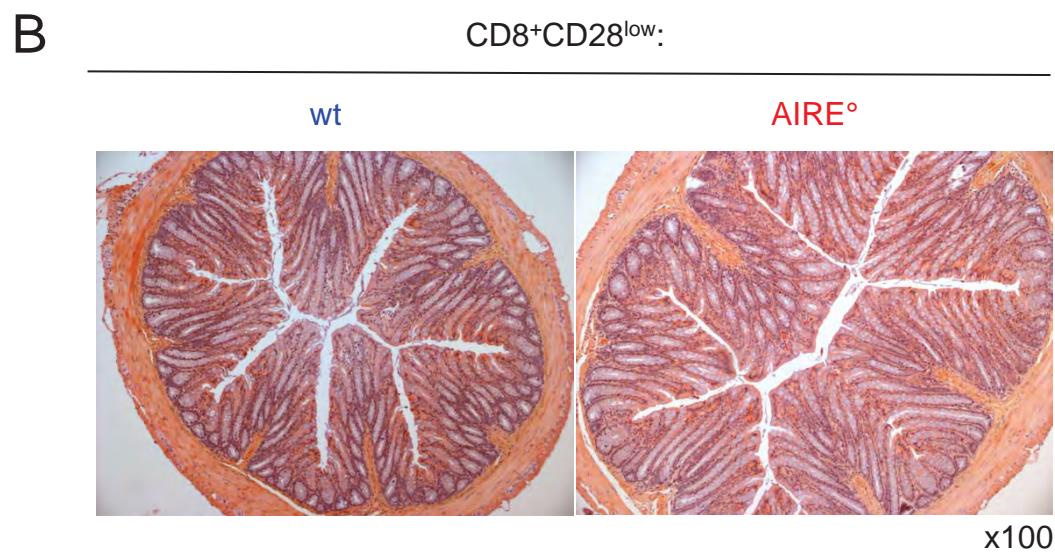
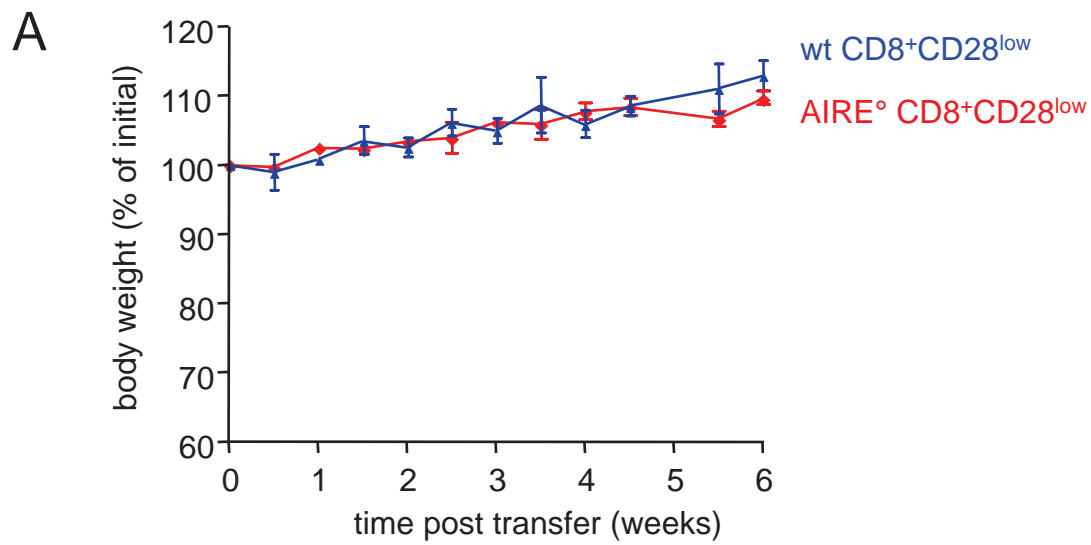


Figure S3

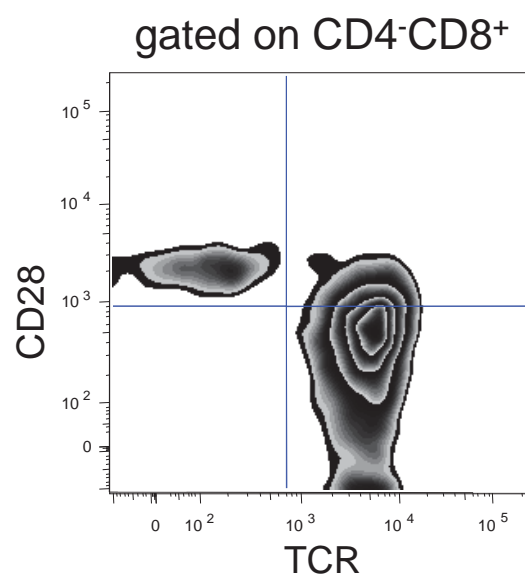
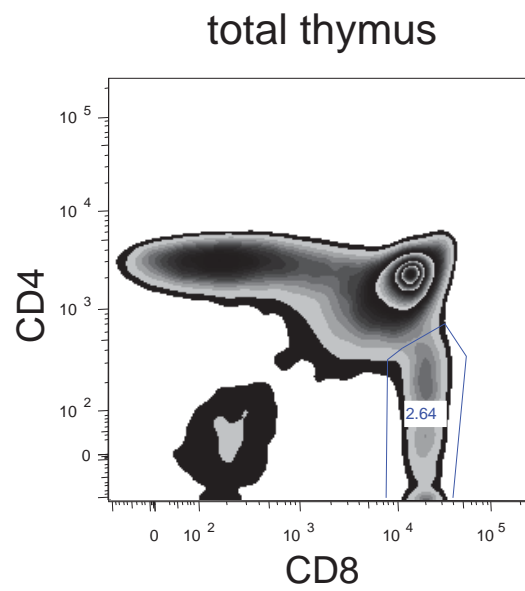


Figure S4

# Mouse and human CD8<sup>+</sup>CD28<sup>low</sup> regulatory T lymphocytes differentiate as a separate lineage in the thymus

Yirajen Vuddamalay<sup>1,2,3</sup>, Rita Vicente<sup>1,2,3</sup>, Céline Pomié<sup>1,2,3</sup>, Geneviève Enault<sup>1,2,3</sup>,  
Bertrand Leobon<sup>4</sup>, Jérémy Kagan<sup>1,2,3</sup>, Olivier Joffre<sup>1,2,3</sup>, Nicolas Fazilleau<sup>1,2,3</sup>,  
Paola Romagnoli<sup>1,2,3</sup>, and Joost P.M. van Meerwijk<sup>1,2,3</sup>

<sup>1</sup> Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (Inserm), U1043, Toulouse, F-31300, France; <sup>2</sup> Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS), U5282, Toulouse, F-31300, France; <sup>3</sup> Université de Toulouse, Université Paul Sabatier, Centre de Physiopathologie de Toulouse Purpan (CPTP), Toulouse, F-31300, France; and <sup>4</sup> Cardiology department, Children's hospital Purpan, Toulouse, F-31059, France.

Corresponding author:

Prof. Joost P.M. van Meerwijk, PhD., Inserm U1043, BP 3028, 31024, Toulouse Cedex 3, France, Phone +33 562 748381, FAX +33 562 744558, E-mail [Joost.van-Meerwijk@inserm.fr](mailto:Joost.van-Meerwijk@inserm.fr)

Running title: Thymic origin of mouse and human CD8<sup>+</sup>CD28<sup>low</sup> Treg

Counts: 199 abstract words; 4000 text words; 5 figures; 1 table; 28 references

## Key points

- Mouse immunosuppressive T lymphocytes of  $CD8^+CD28^{low}$  phenotype differentiate as a separate lineage in the thymus
- We describe a novel homologous population of  $CD8^+CD28^{low}$  regulatory T cells in humans and show they differentiate in the thymus



## Abstract

Regulatory T lymphocytes (Treg) play a central role in the control of immune responses and thus maintain immune tolerance and homeostasis. In mice, expression of the CD8 co-receptor and low levels of the co-stimulatory molecule CD28 characterizes a Treg population that exerts potent suppressive function *in vitro* and efficiently controls experimental immunopathology *in vivo*. It has remained unclear if CD8<sup>+</sup>CD28<sup>low</sup> Treg develop as a separate lineage in the thymus or represent a population of cells differentiating in the periphery, as suggested by their CD28<sup>low</sup> phenotype. Here we demonstrate that functional CD8<sup>+</sup>CD28<sup>low</sup> Treg are present in the thymus and that these cells develop locally and are not recirculating from the periphery. Differentiation of CD8<sup>+</sup>CD28<sup>low</sup> Treg requires major histocompatibility complex (MHC) class I-expression on radioresistant but not on hematopoietic thymic stromal cells and these cells have a very diverse TCR-repertoire, indicating that they represent a genuinely adaptive T lymphocyte lineage. In contrast to other Treg, CD8<sup>+</sup>CD28<sup>low</sup> Treg develop simultaneously with CD8<sup>+</sup>CD28<sup>high</sup> conventional T cells. We also identified a novel homologous naïve CD8<sup>+</sup>CD28<sup>low</sup> T cell population with immunosuppressive properties in human blood and thymus. Combined, our data demonstrate that CD8<sup>+</sup>CD28<sup>low</sup> Treg constitute a thymus-derived ‘natural’ Treg population in mice and in humans.

## Introduction

Treg play a major role in the modulation of innate and adaptive immune responses to self- and non-self antigens. Their contribution to the maintenance of immune homeostasis is significant, ranging from prevention of auto-immune pathology to inhibition of chronic inflammation in the gut, fine regulation of immune responses to infection, and protection of the semi-allogeneic fetus in the uterus. To date, the most extensively studied Treg population is characterized by expression of the co-receptor CD4 and the forkhead/winged helix transcription factor Foxp3<sup>1</sup>. However, other regulatory subsets have recently been described within both CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T cell populations. Accumulating evidence suggests that these populations play an important role in immune regulation<sup>2,3</sup>.

In mice, reduced expression of the co-stimulatory molecule CD28 characterizes a CD8<sup>+</sup> population with potent *in vitro* and *in vivo* immunoregulatory capacity. CD8<sup>+</sup>CD28<sup>low</sup> Treg inhibit proliferation and IFN- $\gamma$  production by conventional T cells (Tconv) *in vitro*. Moreover, they prevent experimental autoimmune encephalomyelitis, myasthenia gravis and inflammatory bowel disease (IBD)<sup>4-6</sup>. IBD protection requires IL-10 production by the Treg and TGF- $\beta$  responsiveness of the colitogenic CD4<sup>+</sup> T cells<sup>5</sup>. Where CD8<sup>+</sup>CD28<sup>low</sup> Treg differentiate remains unknown. In humans, CD8<sup>+</sup> Treg lacking expression of CD28 have been observed in the blood of patients that had accepted, but not of those that had rejected, a kidney or heart transplant<sup>7,8</sup>, and in tumor-infiltrating lymphocytes as well as in the blood of cancer patients<sup>9</sup>. However, these CD8<sup>+</sup>CD28<sup>neg</sup> cells are phenotypically very distinct from mouse CD8<sup>+</sup>CD28<sup>low</sup> Treg, which express clearly detectable levels of CD28. A homologous CD8<sup>+</sup>CD28<sup>low</sup> population has, to our knowledge, not been described in humans. Here, we assessed the existence of human CD8<sup>+</sup>CD28<sup>low</sup> Treg.

The extensively described  $\text{Foxp3}^+$  Treg have two distinct origins. ‘Natural’ Treg (nTreg) develop in the thymus from hematopoietic precursors whilst ‘induced’ Treg (iTreg) differentiate from activated Tconv in the periphery under special ‘tolerogenic’ conditions <sup>10</sup>. The circulating pool of Treg is therefore composed of both nTreg and iTreg. Recent evidence suggests that these two populations have distinct non-redundant functions in maintaining immune tolerance. In the IBD model, only the combination of both  $\text{CD4}^+\text{Foxp3}^+$  nTreg and iTreg could fully protect from the pathology suggesting a non-redundant division of labor between these two populations <sup>11</sup>. These populations also acted synergistically in the prevention of the lymphoproliferative disorder and autoimmunity in *Foxp3*-deficient mice <sup>12</sup>. Recently, Zheng and colleagues have identified the intronic *Foxp3* enhancer CNS1 as being a critical element for the differentiation of  $\text{Foxp3}^+$  iTreg <sup>13</sup>. In CNS1-deficient mice, reduced levels of iTreg led to Th2 inflammation confined to the gastrointestinal tract further underlining the distinct functions of nTreg and iTreg in immune homeostasis <sup>14</sup>. Identifying the (intra- or extra-thymic) origin of  $\text{CD8}^+\text{CD28}^{\text{low}}$  Treg is therefore an essential step towards understanding their physiological relevance. Here we investigated the potential thymic origin of  $\text{CD8}^+\text{CD28}^{\text{low}}$  Treg in mice and in humans.

## Materials and Methods

### *Mice*

Mice were used at 6 to 10 weeks of age, unless indicated otherwise. NMRI and C57BL/6 (B6) mice were purchased from the Centre de Recherche et d'Elevage Janvier (Le Genest St Isle, France). B6 Thy1.1, B6  $\beta 2m^o$ <sup>15</sup>, and B6 Rag-GFP mice<sup>16</sup> were bred in our SPF animal facility. All experiments involving animals were performed in compliance with the relevant laws and institutional guidelines (Regional approval # 31 09 555 45, ethical review # MP/08/14/02/12).

### *Human samples*

Peripheral blood mononuclear cells (PBMC) were isolated from buffy coats obtained from the local blood transfusion service (Etablissement Français du Sang, Purpan Hospital, Toulouse). Human thymus tissue from children undergoing cardiac surgery was obtained from the Cardiology department of the Children's hospital, Purpan. In line with French guidelines, the French authorities authorized the study (MESR # DC-2014-2088) and the participants' legal representatives did not oppose to the use of the thymic fragments for research purposes.

### *Flow cytometry analysis*

The following reagents specific for mouse (m) or human (h) antigens were used: anti-mTCR $\beta$ -FITC ; anti-mTCR $\beta$ -allophycocyanin; anti-mCD8 $\alpha$ -AF700; anti-mCD24-FITC; anti-mCD44-FITC; anti-mCD69-FITC; anti-mCD122-FITC; anti-mCD28-biotin; streptavidin-PE, all from eBiosciences (San Diego, CA); anti-hCD3-PeCy7; anti-hCD4-FITC; anti-mCD4-PeCy7; anti-mCD4-Pacific Blue; anti-mCD8 $\alpha$ -FITC; anti-hCD8-BV421; anti-hCD8-AF700; anti-mCD25-PE; anti-hCD28-PE; anti-

mCD45RB-FITC; anti-hCD45RA-PECF594; anti-mCD62L-FITC; anti-mFoxp3-PE; anti-hIL10-PE; anti-hLAP-PE; anti-mPD1-FITC, all from BD-Pharmingen (Heidelberg, Germany); anti-mNeuropilin-PE from R&D Systems (Lille, France); TO-PRO®-3 from life technologies (Saint-Aubin, France). Cells were incubated with saturating levels of antibodies. Thus labeled cells were analyzed on a FACS LSRII (Becton Dickinson, Pont de Claix, France) using DIVA (Becton Dickinson) and FlowJo software (Tree Star, Ashland, OR).

### *Isolation of T-cell subsets*

Murine splenic  $CD8^+CD28^{low}$  Treg were isolated as previously described<sup>5</sup>. To isolate murine thymic  $CD8^+CD28^{low}$  and  $CD8^+CD28^{high}$  T cells, cell suspensions were first depleted of  $CD4^+$  thymocytes through complement-mediated lysis using an anti-CD4 antibody (RL172.4) and rabbit complement (HD supplies, Aylesbury, UK). The thus obtained cell suspension was then labelled with anti-Fc $\gamma$ RII/III (2.4G2), anti-CD4 (RL172.4), anti-major histocompatibility complex (MHC) class II (M5), and anti-B220 (RA3-6B2) antibodies prior to negative selection sheep anti-rat IgG Dynabeads (DynaL biotech, Oise, France). The resulting population was labeled with anti-mCD8 $\alpha$ -AF700, anti-mCD4-PB, anti-mTCR-allophycocyanin and anti-mCD28-biotin followed by streptavidin-PE, and  $CD8^+CD4^-TCR^{high}CD28^{high}$  and  $CD8^+CD4^-TCR^{high}CD28^{low}$  cells were sorted on a FACS Aria II SORP (Becton Dickinson). Isolation of Rag-GFP $^+$  $CD8^+CD4^-TCR^{high}CD28^{low}$  cells from B6 Rag-GFP mice required an additional gating on GFP $^+$  cells prior to cell sorting. Murine responder  $CD4^+$  T cells used in *in vitro* assays were enriched from erythrocyte-depleted splenocytes by Dynabead-mediated depletion of Fc $\gamma$ RIII $^+$ , MHC class II $^+$ , CD8 $^+$ , and B220 $^+$  cells.

Human  $CD8^+CD28^{low}$  and  $CD8^+CD28^{high}$  T cells were isolated from PBMC as follows. Cell suspensions were first incubated with a cocktail of mouse antibodies specific for  $CD4^+$  T cells, B cells, Natural-killer cells, monocytes, platelets, dendritic cells, granulocytes and erythrocytes (Life Technologies) and thus labeled cells eliminated using anti-mouse IgG-labeled Dynabeads (Dyna biotech). The resulting population was labeled with anti-hCD3-PeCy7, anti-hCD8-BV421, anti-hCD28-PE and anti-hCD45RA-PECF594, the  $CD8^+CD3^{high}CD45RA^{high}CD28^{high}$  and the  $CD8^+CD3^{high}CD45RA^{high}CD28^{low}$  populations were sorted using a FACS Aria II SORP (Becton Dickinson). Human thymic  $CD8^+CD28^{low}$  and  $CD8^+CD28^{high}$  T cells were isolated as follows. Cell suspension was incubated with anti-CD4 (OKT4) antibodies and thus labeled cells eliminated as described above. The resulting population was labeled with anti-hCD3-PeCy7, anti-hCD4-FITC, anti-hCD8-AF400, anti-hCD28-PE antibodies and  $CD8^+CD4^-CD3^{high}CD28^{high}$  and  $CD8^+CD4^-CD3^{high}CD28^{low}$  cells were sorted using a FACS Aria II SORP (Becton Dickinson). A purity of > 94% was obtained routinely for both murine and human sorted T cell populations.

#### *Production of immunosuppressive mediators by human T cells*

Sorted cells were stimulated for one week with bead-bound anti-CD3 and anti-CD28 antibodies (Life Technologies) in a 1:1 cell-to-bead ratio in the presence of IL-2 (30U/ml, Peprotech, Neuilly sur Seine, France). Cells were then stained with the indicated cell-surface markers, anti-LAP antibodies, and TOPRO-3 to exclude dead cells. For intracellular detection of IL-10, cells were re-stimulated with Phorbol myristate acetate (50ng/ml) and ionomycin (1 $\mu$ g/ml), both from Sigma-Aldrich (Saint-Quentin Fallavier, France) for 5h at 37°C and Brefeldin A (10 $\mu$ g/ml,

eBiosciences) was added for the last four hours. Cells were stained for indicated surface-markers, fixed with 2% paraformaldehyde for 30min at 4°C, permeabilized in 0.5% saponin/1% BSA in PBS for 30 min at RT, and then incubated for 30min at RT with PE-conjugated anti-IL-10 in permeabilization buffer.

#### *Bone marrow chimeras*

Bone marrow cells from femurs and tibias were prepared as previously described <sup>17</sup>.  $5 \cdot 10^6$  donor cells were then injected intravenously into  $\gamma$ -irradiated hosts (8.5 Gy  $\gamma$ ; <sup>137</sup>Cs source, 6.3 Gy/min).

#### *TCR-repertoire analyses*

V $\alpha$  and V $\beta$  expression pattern and immunoscope analysis were performed as described previously <sup>18</sup>.

#### *In vitro suppression assays*

Suppressive activity of indicated T cell populations was assessed as described previously <sup>18</sup>.

#### *In vitro thymic organ cultures*

Thymic lobes were surgically removed from NMRI fetuses at gestational day 15. The lobes were placed on cell culture inserts (pore size: 0.4 $\mu$ m) in 6-well tissue culture plates (Becton Dickinson) with standard RPMI complete medium supplemented with 10% FCS. At different days of culture, the thymic lobes were harvested and single cell suspensions were prepared and analyzed for CD4, CD8, CD28 and TCR $\beta$  expression by flow cytometry.



### *Statistical analysis*

Statistical significance was determined using the Mann-Whitney and the Wilcoxon tests.

## Results

### *Functional CD8<sup>+</sup>CD28<sup>low</sup> Treg are present in the mouse thymus*

We have previously observed that CD8<sup>+</sup>CD28<sup>low</sup> T cells freshly isolated from the spleen of wild-type (wt) mice exerted suppressive activity <sup>5</sup>. To determine if these cells are present in the thymus of wt mice, we analyzed the expression of CD28 on mature CD4<sup>-</sup>CD8<sup>+</sup>TCR<sup>high</sup> ('CD8SP') thymocytes (Fig. 1A). If the distribution of CD28 staining of a population is Gaussian, the median and mean fluorescence intensities are equal. However, the median fluorescence intensity of the CD28 staining on CD8SP cells was lower than its mean value (475±65 vs. 657±74, p<0.001, n=8), indicating the existence of a CD28<sup>low</sup> population. Similar observations were made on CD8<sup>+</sup>TCR<sup>high</sup> splenocytes (352±55 vs. 486±69, n=9, p<0.001). By contrast, the median and mean fluorescence intensities of CD28 staining on CD4<sup>+</sup>TCR<sup>high</sup> thymocytes were similar (1794±308 vs. 1954±344, n=8, p=0.23), indicating a Gaussian distribution. Together, these data demonstrate the existence of CD8SP/CD28<sup>low</sup> thymocytes. The minimal estimate of the percentage of CD8SP/CD28<sup>low</sup> cells was defined as the percentage of CD8SP cells expressing CD28 at levels lower than the mean fluorescence intensity (MFI), minus the percentage of CD8SP cells expressing CD28 at levels higher than the MFI. This strategy revealed that a substantial proportion of CD8SP cells (18.3±0.4%) expressed low levels of CD28 in the thymus of wt mice, similar to what we found in the spleen (26.4±1.1%). Thymic CD8SP/CD28<sup>low</sup> T cells did not express Foxp3, CD25, and neuropilin1, characteristic markers for CD4<sup>+</sup> Treg (Fig. 1B). The low levels of expression of PD1, CD122, and CD44 indicated a naïve phenotype of these cells. Similar results were obtained for splenic CD8<sup>+</sup>CD28<sup>low</sup> T cells (Fig. 1B). However, whereas in the spleen the expression of the activation/maturation markers CD24, CD45RB, CD69 and

CD62L was similar between CD8<sup>+</sup>CD28<sup>low</sup> cells and their CD28<sup>high</sup> counterparts, in the thymus most CD8SP/CD28<sup>low</sup> cells expressed lower levels of CD24 and CD69 and higher levels of CD62L and CD45RB as compared to CD8SP/CD28<sup>high</sup> thymocytes (Fig. 1B). These observations indicate that thymic CD8SP/CD28<sup>low</sup> Treg are more mature than their CD28<sup>high</sup> conventional counterparts, similar to thymic precursors of CD4<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> Treg vs. CD4<sup>+</sup>Foxp3<sup>-</sup> Tconv<sup>19</sup>.

To assess if thymic CD8SP/CD28<sup>low</sup> cells are Treg, we next analyzed the *in vitro* suppressive capacity of CD28<sup>low</sup> vs. CD28<sup>high</sup> CD8SP thymocytes. FACS-sorted thymic CD8SP/CD28<sup>high</sup> and CD8SP/CD28<sup>low</sup> T cells were cultured with CFSE-labeled CD4<sup>+</sup> responder T cells, at a 1:1 ratio. T-cell stimulation was achieved using antigen-presenting cells (APC) and anti-CD3 antibody. Proliferation of CD4<sup>+</sup> responder T cells (as assessed by CFSE dilution) was efficiently suppressed by thymic CD8SP/CD28<sup>low</sup> thymocytes but not by their CD28<sup>high</sup> counterparts (Fig. 1C). These data show that thymic CD8SP/CD28<sup>low</sup> T cells possess *in vitro* suppressive activity, suggesting that these Treg may develop in the thymus.

*Thymic development of CD8SP/CD28<sup>low</sup> cells occurs concomitantly with that of CD8SP/CD28<sup>high</sup> thymocytes*

CD8<sup>+</sup>CD28<sup>low</sup> Treg may differentiate from CD8<sup>+</sup>CD28<sup>high</sup> Tconv in e.g. peripheral lymphoid organs. If so, and if they were able to home back to the thymus, they would appear later than their CD28<sup>high</sup> conventional counterpart in this organ of lymphopoiesis. We therefore analyzed the kinetics of appearance of CD8SP/CD28<sup>low</sup> cells in the thymus during ontogeny. Very limited numbers of mature CD8SP/CD28<sup>low</sup> T cells were already present in the thymus of newborns and they then developed in parallel with CD8SP/CD28<sup>high</sup> T cells (Figs. 2A, 2B). The

percentage of CD28<sup>low</sup> cells among CD8SP thymocytes was constant (at 17.8±2.1%) during the first nine days of life. These observations strongly suggest that CD8<sup>+</sup>CD28<sup>low</sup> T cells develop in the thymus and do not recirculate from the periphery.

We also analyzed the development of CD8SP/CD28<sup>low</sup> cells in fetal thymus organ cultures (FTOC) in which mature T cells develop from immature precursors and recirculation cannot take place. After seven days of *in vitro* culture of gestational day 15 fetal thymi, CD8SP/TCR<sup>high</sup> cells started to appear (Figs. 2C and 2D). The percentage of CD28<sup>low</sup> cells among CD8SP thymocytes was constant (at 17.7±2%) during the next six days of culture. Combined, these data therefore establish that CD8SP/CD28<sup>low</sup> T cells can develop in the thymus and differentiate simultaneously with CD8SP/CD28<sup>high</sup> cells.

#### *CD8SP/CD28<sup>low</sup> T cells with in vitro suppressor activity develop in the thymus*

T lymphocytes can recirculate from the periphery back to the thymus (reviewed in ref. 20). Hence, even if during ontogeny CD8SP/CD28<sup>low</sup> T cells develop intrathymically, in adult mice thymic CD8SP/CD28<sup>low</sup> Treg could have acquired their regulatory phenotype in the periphery before migrating back to the thymus. To assess this possibility, we made use of Rag-GFP mice. In these BAC-transgenic mice, the gene encoding green fluorescent protein (GFP) is under the control of the *Rag2* promoter<sup>16</sup>. Expression of recombinase activating gene (RAG)2 in the early stages of thymocyte development is thus concomitant with that of GFP. After thymic positive selection of T cell precursors, transcription downstream of the *Rag2* promoter is rapidly terminated<sup>21</sup> and the transgene-derived GFP-protein decays with a half-life of approximately 56h<sup>22</sup>. Hence, in the thymus, “freshly” developed mature T cells

express GFP while recirculating or long-term resident T cells do not. In Rag-GFP mice, we observed that GFP expression was bimodal in CD4/CD8 double-negative thymocytes and maximum in double-positive thymocytes (Fig. 2E), which is in agreement with previously published data<sup>22</sup>. Most of the mature CD8SP/CD28<sup>high</sup> as well as the CD8SP/CD28<sup>low</sup> T cells still expressed Rag-GFP. CD8SP/CD28<sup>low</sup> thymocytes displayed lower Rag-GFP levels than their CD28<sup>high</sup> counterparts (Fig. 2E), which is consistent with their more mature phenotype (Fig. 1B). However, some CD8SP/CD28<sup>low</sup> thymocytes lacked Rag-GFP and were therefore recirculating or long-term thymus resident cells. The proportions of Rag-GFP<sup>+</sup> cells among the CD28<sup>high</sup> vs. CD28<sup>low</sup> CD8SP thymocyte populations were comparable (21.7±2.6 and 22.8±5.1%, respectively).

To assess if *de novo* developing CD8SP/CD28<sup>low</sup> thymocytes were Treg, we then sorted Rag-GFP<sup>+</sup> CD8SP/CD28<sup>low</sup> T cells and analyzed their suppressive activity in an *in vitro* assay. These cells efficiently suppressed proliferation of CD4<sup>+</sup> responder T cells in a dose-dependent manner (Fig. 2F). These data firmly demonstrate that CD8SP/CD28<sup>low</sup> T cells with regulatory function can develop in the thymus of mice.

#### *Development of CD8SP/CD28<sup>low</sup> Treg requires MHC class I expression on radioresistant stromal cells*

Peripheral activation of naïve T lymphocytes requires MHC-expression by (radiosensitive) APC of hematopoietic origin. If CD8<sup>+</sup>CD28<sup>low</sup> Treg were peripherally induced cells, they should therefore not (or less) develop in irradiation-chimeras in which MHC class I expression is restricted to the radioresistant compartment. On the other hand, thymic differentiation of most T cell-populations requires MHC expression on radioresistant epithelial cells (reviewed in ref. 23). However, a small

population of Natural-Killer-T cells with strong immunomodulatory function develops upon interaction with non-classical MHC class I molecules expressed by immature thymocytes (i.e. developing T cells, reviewed in ref. 24). To distinguish between thymic vs. peripheral differentiation of CD8<sup>+</sup>CD28<sup>low</sup> Treg, we assessed if MHC class I expression by radioresistant and/or hematopoietic cells is sufficient for development of CD8SP/CD28<sup>low</sup> Treg. Absence of these cells in  $\beta$ 2 microglobulin-deficient ( $\beta$ 2m<sup>o</sup>) mice established that they required MHC class I for their development (data not shown). We then generated bone-marrow (BM) chimeras in which MHC class I expression was confined to radioresistant and/or radiosensitive cells. Lethally irradiated wt or  $\beta$ 2m<sup>o</sup> hosts were reconstituted with BM from wt or  $\beta$ 2m<sup>o</sup> donors. Eight weeks after reconstitution, we analyzed the presence, proportion, and suppressive function of the CD8SP/CD28<sup>low</sup> Treg population in the thymi of these chimeras (Fig. 3). As expected, we did not detect mature CD8SP/CD28<sup>low</sup> T cells in the thymus of  $\beta$ 2m<sup>o</sup> hosts reconstituted with wt BM ( $\beta$ 2m<sup>o</sup>→wt chimeras, Fig. 3A). On the other hand, we found similar proportions of thymic CD8SP/CD28<sup>low</sup> T cells in  $\beta$ 2m<sup>o</sup>→wt and wt→wt chimeras (Figs. 3A and B). Moreover, CD8SP/CD28<sup>low</sup> T cells isolated from the thymus of  $\beta$ 2m<sup>o</sup>→wt chimeras exhibited a dose-dependent *in vitro* suppressor function comparable to that of Treg from wt→wt controls (Fig. 3C). Similar results were obtained for splenic CD8<sup>+</sup>CD28<sup>low</sup> Treg from these chimeras (data not shown). Altogether, our data indicate that development of CD8SP/CD28<sup>low</sup> Treg requires MHC class I expression by radioresistant thymic cells. Class I-expression by hematopoietic elements is not required and does not increase the proportion of these cells, supporting our conclusion that the CD8SP/CD28<sup>low</sup> Treg phenotype is not induced in the periphery.

### *The TCR repertoire of CD8<sup>+</sup>CD28<sup>low</sup> cells is very diverse*

To further search for the potential presence of induced cells among peripheral CD8<sup>+</sup>CD28<sup>low</sup> Treg, we compared the TCR repertoires of splenic CD8<sup>+</sup>CD28<sup>low</sup> and CD8<sup>+</sup>CD28<sup>high</sup> T cells. TCR V $\alpha$  and V $\beta$  usage was very diverse. Moreover, it was similar between CD8<sup>+</sup>CD28<sup>low</sup> and CD8<sup>+</sup>CD28<sup>high</sup> T cells (Figs. 4A, 4B). Immunoscope analysis of all V $\alpha$  and V $\beta$  domains revealed Gaussian-like distributions of complementarity determining region 3 (CDR3) lengths, which are the hallmarks of polyclonal repertoires. Furthermore, the Immunoscope profiles obtained for CD8<sup>+</sup>CD28<sup>low</sup> Treg were very similar to those of CD8<sup>+</sup>CD28<sup>high</sup> Tconv (Fig. 4C). No clonal expansion was found in any of the 21 TCR-V $\alpha$  and 24 V $\beta$  CDR3 analyzed (not shown). Together, these data show that CD8<sup>+</sup>CD28<sup>low</sup> Treg have a very diverse TCR repertoire, thus supporting our conclusion that, in unmanipulated laboratory mice, they are in majority of thymic origin rather than induced in the periphery. This observation also indicates that these cells recognize classical MHC class I/peptide complexes rather than non-classical MHC class I molecules.

### *Identification of CD8<sup>+</sup>CD28<sup>low</sup> Treg in human blood and thymus*

We next searched for CD8<sup>+</sup>CD28<sup>low</sup> T cells in the blood of healthy humans. Analysis of PBMC showed a heterogeneous pattern: Most individuals had a discrete population of CD28<sup>neg</sup> cells (9 out of 11 samples analyzed) whereas others lacked this population. In contrast to CD28<sup>pos</sup> cells, which were mostly CD45RA<sup>high</sup>, most CD28<sup>neg</sup> cells were CD45RA<sup>low</sup> and were therefore activated/memory cells (Fig. 5A). When we focused on naïve CD8<sup>+</sup>CD45RA<sup>high</sup>CD28<sup>pos</sup> T cells, we observed that the median fluorescence intensity of CD28 staining is significantly lower than its mean value (P<0.01, n=9). The minimal estimate of the percentage of CD8<sup>+</sup>CD28<sup>low</sup> cells

was defined as the percentage of CD8<sup>+</sup>CD28<sup>pos</sup> cells expressing CD28 at levels lower than the MFI, minus the percentage of CD8<sup>+</sup>CD28<sup>pos</sup> cells expressing CD28 at levels higher than the MFI (Fig. 5B). This strategy revealed a rather similar proportion of CD28<sup>low</sup> cells among naïve CD8<sup>+</sup> T lymphocytes in the several samples analyzed (10.1±3.2%). We next analyzed if CD8<sup>+</sup>CD28<sup>low</sup> peripheral T cells produce the immunosuppressive mediators TGF-β and IL-10, known to play a non-redundant role in the *in vivo* function of these cells in experimental mouse models. After one-week *in vitro* activation, a substantial fraction of CD28<sup>low</sup> (but less CD28<sup>high</sup>) cells expressed cell-surface TGF-β (as measured by surface expression of latency-associated peptide, LAP) or intracellular IL-10 (Fig. 5C, Table I). These data show that the naïve CD8<sup>+</sup>CD28<sup>low</sup> lymphocyte population in human blood is enriched in cells producing immunosuppressive mediators.

We then assessed if CD8<sup>+</sup>CD28<sup>low</sup> Treg develop in the human thymus. Flow-cytometry analysis revealed that the median fluorescence intensity of CD28 staining on CD8SP thymocytes is significantly lower than its mean value (P<0.01, n=8). The proportion of CD28<sup>low</sup> cells among thymic CD8SP cells was 26.3±1.4% (Fig. 5B) and was remarkably constant during early life (Fig. 5D). We next assessed if CD8SP/CD28<sup>low</sup> cells produced TGF-β. A very substantial fraction of CD28<sup>low</sup> CD8SP thymocytes, and much less CD28<sup>high</sup> cells, produced this critical immunosuppressive mediator (Fig. 5E, Table I). Collectively, these data therefore strongly suggest that CD8<sup>+</sup>CD28<sup>low</sup> cells with immunosuppressive potential develop in the human thymus.



## Discussion

In this report we address the thymic vs. peripheral origin of mouse CD8<sup>+</sup>CD28<sup>low</sup> Treg and their potential existence in humans. We show that functional Treg are found in the murine thymus and that they develop locally and are not recirculating from the periphery. We also identify in human blood and thymus a novel homologous population of CD8<sup>+</sup>CD28<sup>low</sup> cells with a naïve phenotype and producing the critical immunosuppressive mediators TGF-β and IL-10. Our results therefore indicate that in mice and humans CD8<sup>+</sup>CD28<sup>low</sup> Treg develop intrathymically.

The origin of CD8<sup>+</sup>CD28<sup>low</sup> Treg in mice had until now remained elusive. Immunization with a myasthenogenic peptide induces a myasthenia gravis-like disease, which can be prevented by injection of a ‘dual altered peptide’ ligand. An *in vivo* expanded CD8<sup>+</sup>CD28<sup>low</sup> population was involved in this phenomenon <sup>4</sup>, suggesting that these cells were peripherally induced Treg. On the other hand, we previously showed that peripheral CD8<sup>+</sup>CD28<sup>low</sup> T cells isolated from unmanipulated wt mice had a naïve phenotype and efficiently inhibited proliferation of and IFN-γ production by CD4<sup>+</sup> responder T cells in mixed lymphocyte cultures. CD8<sup>+</sup>CD28<sup>low</sup> (but not CD8<sup>+</sup>CD28<sup>high</sup>) cells also effectively prevented IBD in an experimental mouse model <sup>5</sup>. Similar results were obtained in the multiple sclerosis model Experimental Autoimmune Encephalomyelitis <sup>6</sup>. These data showed that CD8<sup>+</sup>CD28<sup>low</sup> Treg can differentiate without intentional manipulation of the immune system and suggest that they are a naturally-occurring population.

We here report that CD8<sup>+</sup>CD28<sup>low</sup> T cells develop in organ cultures of mouse fetal thymi and that CD8<sup>+</sup>CD28<sup>low</sup> and CD8<sup>+</sup>CD28<sup>high</sup> T cells simultaneously develop during ontogeny. Moreover, newly developing CD8SP/CD28<sup>low</sup> thymocytes had *in vitro* immunosuppressive activity. These data demonstrate a thymic origin of CD8<sup>+</sup>CD28<sup>low</sup>

Treg. Our observations that in chimeras in which hematopoietic APC lack MHC class I-expression the proportion of CD8<sup>+</sup>CD28<sup>low</sup> Treg is not affected and that the TCR-repertoire of these cells is very diverse, are both rather incompatible with them being peripherally induced cells and therefore support a thymic origin. We recently reported that CD8<sup>+</sup>CD28<sup>low</sup> Treg from Auto Immune REgulator-deficient mice failed to prevent experimental IBD in the mouse <sup>18</sup>. The here reported data suggest that this transcription factor (which is expressed by stromal cells in the thymus and in lymph-nodes) plays a role in the thymic selection of the TCR-repertoire of CD8<sup>+</sup>CD28<sup>low</sup> Treg. Importantly, our data do not exclude the possibility that some CD8<sup>+</sup>CD28<sup>low</sup> Treg can also differentiate in the periphery from CD8<sup>+</sup>CD28<sup>high</sup> Tconv, similar to the activation- and cytokine-dependent peripheral differentiation of CD4<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> Treg <sup>25,26</sup>.

In humans, Treg of CD8<sup>+</sup>CD28<sup>neg</sup> phenotype have previously been described<sup>8</sup>. This population lacks expression of CD28, has an activated CD45RO<sup>+</sup> and HLA class II<sup>+</sup> phenotype and produces neither IL-10 nor TGF-β <sup>7,8</sup>. It is therefore distinct from the human CD8<sup>+</sup>CD28<sup>low</sup> Treg we describe here since the latter cells express clearly detectable levels of CD28 and have a naïve CD45RA<sup>high</sup> phenotype. Identified in the blood, we also detected substantial proportions of these cells in the human thymus. Whereas no specific markers exist to distinguish between newly developing and recirculating CD8 thymocytes, the proportion of CD28<sup>low</sup> cells among CD8SP thymocytes was very constant during early life. The latter observation, combined with their naïve phenotype, provides supplementary support for our conclusion that CD8<sup>+</sup>CD28<sup>low</sup> Treg develop within the human thymus.

We here show that the CD8<sup>+</sup>CD28<sup>low</sup> T cell-repertoire in mice is very diverse and, by immunoscope analysis, very much resembles that of CD8<sup>+</sup>CD28<sup>high</sup> cells. These data

strongly suggest that  $CD8^{+}CD28^{low}$  Treg are restricted by classical MHC class I molecules, in contrast to the Qa-1 restricted  $CD8^{+}$  Treg described previously<sup>27,28</sup>.

In conclusion, the data presented here firmly demonstrate a thymic origin for  $CD8^{+}CD28^{low}$  Treg, which should therefore be considered (at least in large part) a ‘natural’ Treg population. The identification of a homologous population in humans opens the way to studying the potential role of these cells in immunopathology. Further work will need to assess the selection-criteria of these developing Treg, their antigen-specificity, and their physiological role in the maintenance of immune-homeostasis.

## Authorship

The authors do not have any conflict of interest with the present work

## Acknowledgements

We thank Fatima-Ezzahra L’Faqihi-Olive, Valérie Duplan-Eche, Delphine Lestrade, and Manon Farce (Inserm U1043 flow cytometry facility) and the personnel of the Inserm/UPS US006 CREFRE animal facility for expert technical assistance; Pamela Fink for providing the Rag-GFP mice, Françoise Auriol and Arnaud Garnier for precious help in obtaining human thymi, and Sabina Müller and Salvatore Valitutti for precious help with analysis of human samples. This work was financially supported by grants from the “Association François Aupetit” (2013, 2014), the “Ligue contre le cancer” (to Y.V.), and the “Fondation ARC pour la recherche sur le cancer” (SFI20101201917, PJA 20131200290).

## Author contributions

YV designed research, performed experiments, analyzed data, and wrote the manuscript, RV and CP designed research, performed experiments, and analyzed data, GE and JK performed experiments and analyzed data, BL contributed vital new reagents, OJ, NF, and PR designed research and analyzed data, JvM designed research, analyzed data, and wrote the manuscript.

## References

1. Cretney E, Kallies A, Nutt SL. Differentiation and function of Foxp3(+) effector regulatory T cells. *Trends Immunol.* 2013;34(2):74-80.
2. Hall BM, Verma ND, Tran GT, Hodgkinson SJ. Distinct regulatory CD4+T cell subsets; differences between naive and antigen specific T regulatory cells. *Curr Opin Immunol.* 2011;23(5):641-647.
3. Pomie C, Menager-Marcq I, van Meerwijk JP. Murine CD8+ regulatory T lymphocytes: the new era. *Hum Immunol.* 2008;69(11):708-714.
4. Ben-David H, Sharabi A, Dayan M, Sela M, Mozes E. The role of CD8+CD28 regulatory cells in suppressing myasthenia gravis-associated responses by a dual altered peptide ligand. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2007;104(44):17459-17464.
5. Menager-Marcq I, Pomie C, Romagnoli P, van Meerwijk JP. CD8+CD28- regulatory T lymphocytes prevent experimental inflammatory bowel disease in mice. *Gastroenterology.* 2006;131(6):1775-1785.
6. Najafian N, Chitnis T, Salama AD, et al. Regulatory functions of CD8+CD28- T cells in an autoimmune disease model. *J Clin Invest.* 2003;112(7):1037-1048.
7. Chang CC, Ciubotariu R, Manavalan JS, et al. Tolerization of dendritic cells by T(S) cells: the crucial role of inhibitory receptors ILT3 and ILT4. *Nat Immunol.* 2002;3(3):237-243.
8. Vlad G, Cortesini R, Suciufoca N. CD8+ T suppressor cells and the ILT3 master switch. *Hum Immunol.* 2008;69(11):681-686.
9. Filaci G, Fenoglio D, Fravega M, et al. CD8+ CD28- T regulatory lymphocytes inhibiting T cell proliferative and cytotoxic functions infiltrate human cancers. *J Immunol.* 2007;179(7):4323-4334.

10. Workman CJ, Szymczak-Workman AL, Collison LW, Pillai MR, Vignali DA. The development and function of regulatory T cells. *Cell Mol Life Sci.* 2009;66(16):2603-2622.
11. Haribhai D, Lin W, Edwards B, et al. A central role for induced regulatory T cells in tolerance induction in experimental colitis. *J Immunol.* 2009;182(6):3461-3468.
12. Haribhai D, Williams JB, Jia S, et al. A requisite role for induced regulatory T cells in tolerance based on expanding antigen receptor diversity. *Immunity.* 2011;35(1):109-122.
13. Zheng Y, Josefowicz S, Chaudhry A, Peng XP, Forbush K, Rudensky AY. Role of conserved non-coding DNA elements in the Foxp3 gene in regulatory T-cell fate. *Nature.* 2010;463(7282):808-812.
14. Josefowicz SZ, Niec RE, Kim HY, et al. Extrathymically generated regulatory T cells control mucosal TH2 inflammation. *Nature.* 2012;482(7385):395-399.
15. Koller BH, Marrack P, Kappler JW, Smithies O. Normal development of mice deficient in beta 2M, MHC class I proteins, and CD8+ T cells. *Science.* 1990;248(4960):1227-1230.
16. Yu W, Nagaoka H, Jankovic M, et al. Continued RAG expression in late stages of B cell development and no apparent re-induction after immunization. *Nature.* 1999;400(6745):682-687.
17. Joffre O, Gorsse N, Romagnoli P, Hudrisier D, van Meerwijk JP. Induction of antigen-specific tolerance to bone marrow allografts with CD4+CD25+ T lymphocytes. *Blood.* 2004;103(11):4216-4221.

18. Pomie C, Vicente R, Vuddamalay Y, et al. Autoimmune regulator (AIRE)-deficient CD8<sup>+</sup>CD28<sup>low</sup> regulatory T lymphocytes fail to control experimental colitis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2011;108(30):12437-12442.
19. Fontenot JD, Dooley JL, Farr AG, Rudensky AY. Developmental regulation of Foxp3 expression during ontogeny. *J Exp Med*. 2005;202(7):901-906.
20. Hale JS, Fink PJ. Back to the thymus: peripheral T cells come home. *Immunol Cell Biol*. 2009;87(1):58-64.
21. Borgulya P, Kishi H, Uematsu Y, von Boehmer H. Exclusion and inclusion of alpha and beta T cell receptor alleles. *Cell*. 1992;69(3):529-537.
22. McCaughy TM, Wilken MS, Hogquist KA. Thymic emigration revisited. *J Exp Med*. 2007;204(11):2513-2520.
23. Anderson G, Takahama Y. Thymic epithelial cells: working class heroes for T cell development and repertoire selection. *Trends Immunol*. 2012;33(6):256-263.
24. Bendelac A, Savage PB, Teyton L. The biology of NKT cells. *Annu Rev Immunol*. 2007;25:297-336.
25. Dons EM, Raimondi G, Cooper DK, Thomson AW. Induced regulatory T cells: mechanisms of conversion and suppressive potential. *Hum Immunol*. 2012;73(4):328-334.
26. Bilate AM, Lafaille JJ. Induced CD4<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> regulatory T cells in immune tolerance. *Annu Rev Immunol*. 2012;30:733-758.
27. Hu D, Ikizawa K, Lu L, Sanchirico ME, Shinohara ML, Cantor H. Analysis of regulatory CD8 T cells in Qa-1-deficient mice. *Nat Immunol*. 2004;5(5):516-523.

28. Tang X, Maricic I, Purohit N, et al. Regulation of immunity by a novel population of Qa-1-restricted CD8alphaalpha+TCRalphabeta+ T cells. *J Immunol.* 2006;177(11):7645-7655.



## Abbreviations:

$\beta_2m$ ,  $\beta$ -2 microglobulin; BM, bone marrow; CD8SP,  $CD8^+CD4^-TCR^{high}$  (CD8 single positive) thymocyte; Foxp3, forkhead/winged helix transcription factor; GFP, green fluorescent protein; IBD, inflammatory bowel disease; LAP, latency-associated peptide; MHC, major histocompatibility complex; MFI, mean fluorescence intensity; PBMC, peripheral blood mononuclear cell; RAG, recombinaase activating gene; TCR, T-cell receptor; Tconv, conventional T lymphocyte; TGF- $\beta$ , transforming growth factor beta; Treg, regulatory T lymphocyte

## Figure legends

### *Fig. 1. Thymic CD8SP/CD28<sup>low</sup> T cells have suppressive activity in vitro*

(A) Definition of mature CD8SP/CD28<sup>low</sup> cells in thymus and spleen. Left-hand panels: CD8/CD4 flow-cytometry profiles of electronically gated TCR<sup>high</sup> cells. Right-hand panels: CD28 profiles of CD8SP T cells electronically gated as indicated in left-hand panels. Control staining (gray line) was performed using an isotype-matched antibody. For the phenotype-analysis in B, an electronic CD28<sup>low</sup> gate (indicated) was placed to include the minimal estimate of the percentage of CD28<sup>low</sup> cells (i.e. [% of cells with CD28 level < MFI] - [% of cells with CD28 level > MFI]).

(B) Phenotype of indicated thymocyte (left) and splenocyte (right) populations, electronically gated as shown in A. Control stainings (gray lines) were performed using isotype-matched antibodies. Results from a typical experiment out of three performed are shown. (C) CD8SP/CD28<sup>low</sup> but not CD8SP/CD28<sup>high</sup> thymocytes inhibit proliferation of CD4<sup>+</sup> effectors *in vitro*. Thymic CD8SP/CD28<sup>low</sup> and CD8SP/CD28<sup>high</sup> T cells isolated from wt B6 mice were cultured with CFSE-labeled responder B6 CD4<sup>+</sup> T cells and APC in the presence of anti-CD3 $\epsilon$  antibody. Proliferation of CD4<sup>+</sup> cells was assessed by FACS analysis of CFSE dilution. Results from a typical experiment out of four performed are shown.

*Fig. 2. CD8<sup>+</sup>CD28<sup>low</sup> Treg originate in the thymus and develop in parallel with CD8<sup>+</sup> Tconv*

(A, B) The proportion of CD8SP/CD28<sup>high</sup> and CD8SP/CD28<sup>low</sup> T cells among total thymocytes was analyzed at indicated age of pups as indicated in the legend to Fig. 1A. Indicated are mean values  $\pm$  SD (n=3). (C, D) Wt fetal thymi (E15) were cultured *in vitro* for up to two weeks. The proportion of mature CD8SP/CD28<sup>high</sup> and CD8SP/CD28<sup>low</sup> T cells among total thymocytes was analyzed at indicated time points. Results from a typical experiment out of three performed are shown. Note that data are represented as a percentage of total thymocytes (A, C) and as a percentage of the respective maximum values of the populations (B, D). (E) Rag-GFP expression in electronically gated CD4<sup>-</sup>CD8<sup>-</sup> ('DN'), CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> ('DP'), mature CD8SP/CD28<sup>low</sup> and CD8SP/CD28<sup>high</sup> thymocyte populations. Results from a typical experiment out of four performed are shown. The horizontal bar indicates Rag-GFP<sup>+</sup> gate used for cell-sorting of newly developed Treg. (F) FACS-sorted thymic Rag-GFP<sup>+</sup> CD8SP/CD28<sup>low</sup> cells (gated as indicated in E, lower panel) were cultured with CFSE-labeled syngeneic CD4<sup>+</sup> responder T cells (at indicated Treg/Tconv ratios) and APC in the presence of anti-CD3 $\epsilon$  antibody. Proliferation of responders was assessed by FACS analysis of CFSE dilution. A typical experiment out of three performed is shown.

*Fig. 3. MHC class I expression on radioresistant but not radiosensitive thymic stromal cells is required for the development of functional CD8SP/CD28<sup>low</sup> Treg*

(A) Lethally irradiated hosts were reconstituted with T cell depleted donor BM ('donor  $\rightarrow$  host'). Eight weeks after reconstitution, proportions of mature CD8SP/CD28<sup>low</sup> T cells were calculated by flow cytometry as indicated in the legend

to Fig. 1A. Flow cytometry profiles (CD8/CD4 of TCR<sup>high</sup> thymocytes, CD28 of CD8SP thymocytes) are representative of four independent experiments. Numbers indicate percentages within indicated electronic gates. (B) Percentage of CD28<sup>low</sup> cells among CD8SP thymocytes in wt → wt and β2m<sup>o</sup> → wt chimeras, calculated as described in the legend to Fig. 1A. Indicated are mean values ± SD (n=9, 5 independent experiments) (C) Thymic CD8SP/CD28<sup>low</sup> T cells electronically sorted from wt → wt and β2m<sup>o</sup> → wt chimeras were cultured with CFSE-labeled syngeneic CD4<sup>+</sup> responder T cells (at indicated Treg/Tconv ratios) and APC in the presence of anti-CD3ε antibody. Proliferation of responders was assessed by FACS analysis of CFSE dilution. Results from a typical experiment out of five performed are shown.

*Fig. 4. CD8<sup>+</sup>CD28<sup>low</sup> Treg have a very diverse TCR repertoire*

TCR Vα (A) and Vβ (B) segment usage of splenic CD8<sup>+</sup>CD28<sup>low</sup> Treg and CD8<sup>+</sup>CD28<sup>high</sup> Tconv as measured by semi-quantitative RT-PCR. Indicated are mean values ± SD (n=5 independent experiments). (C) CDR3 length-distribution of indicated variable domains. Shown are typical results for indicated Vα–Cα and Vβ–Cβ CDR3s. “10” indicates a CDR3 length of 10 amino-acids, other peaks are separated by 3 nucleotides (1 amino-acid). Similar data were obtained for all other Vα and Vβ segments studied (not shown). Results from a typical experiment out of five performed are shown.

*Fig. 5. Identification of human CD8<sup>+</sup>CD28<sup>low</sup> Treg in blood and thymus*

(A) A CD28 profile (left panel) of a PBMC sample in which a discrete CD28<sup>neg</sup> population was observed. CD45RA expression on CD28<sup>neg</sup> (open curve) and CD28<sup>pos</sup> (black curve) CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>TCR<sup>high</sup> PBMC (right panel, gated as in left panel). (B) Definition of mature CD28<sup>low</sup> cells from PBMC and thymus. Top panels: CD8/CD4 profiles of PBMC and thymocytes, electronically gated as indicated. Bottom panels: CD28 profiles of CD8 T cells electronically gated as shown in top panels. The percentage of CD28<sup>low</sup> cells were determined as described in the legend to Fig. 1A. For cell-sorting, an electronic CD28<sup>low</sup> gate (horizontal solid line) was placed that included the thus calculated percentage. (C) CD28<sup>low</sup> and CD28<sup>high</sup> CD8<sup>+</sup>TCR<sup>high</sup>CD45RA<sup>high</sup> PBMC were activated *in vitro* and then stained for surface expression of LAP (top panels) or intracellular expression of IL-10 (bottom panels). (D) The percentage of CD28<sup>low</sup> cells among CD8SP thymocytes was analyzed in samples from patients of indicated age. (E) Thymic CD8SP/CD28<sup>low</sup> and CD8SP/CD28<sup>high</sup> cells were activated *in vitro* and then stained for surface expression of LAP. In C and E, results from a typical experiment out of three performed are shown (see also Table I).

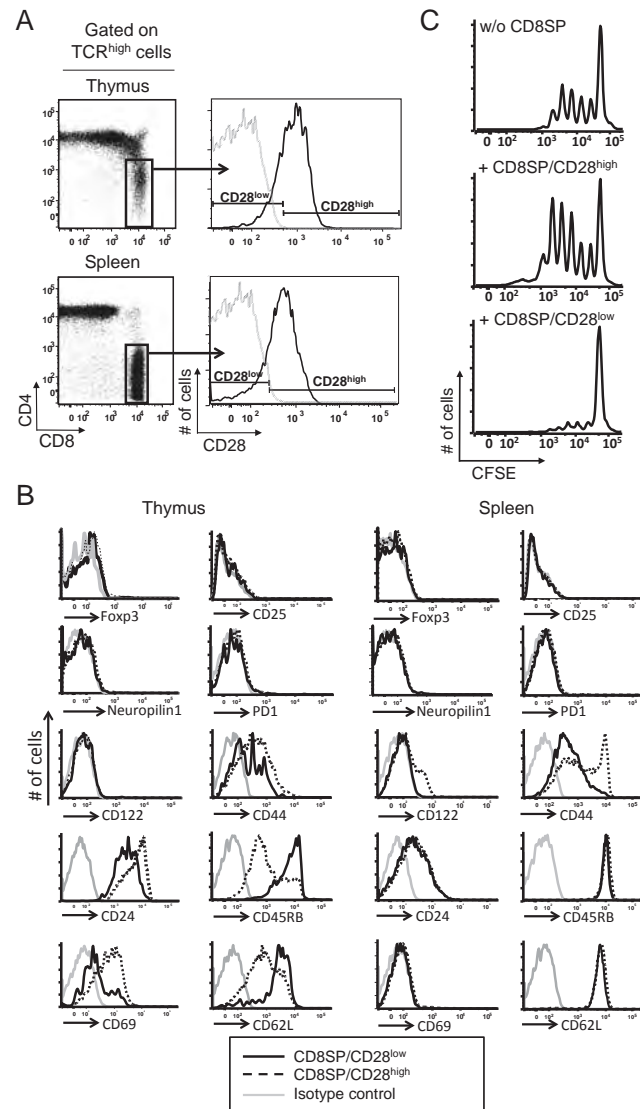


Fig. 1

Fig. 2

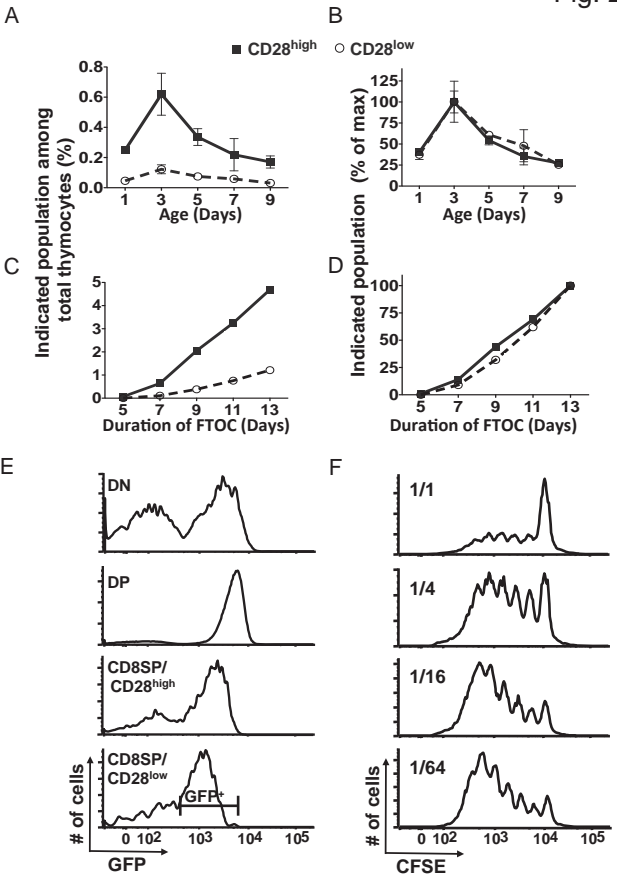


Fig. 3

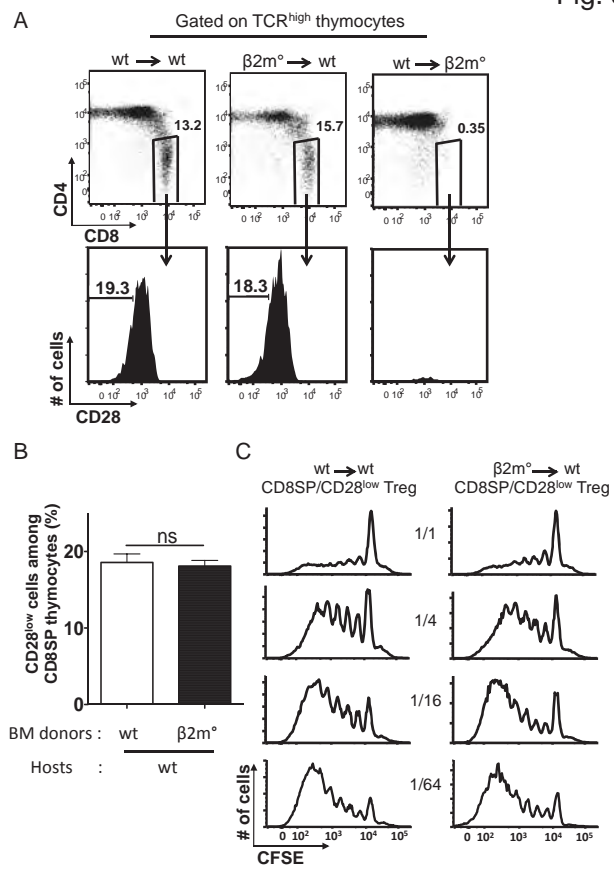




Fig. 4

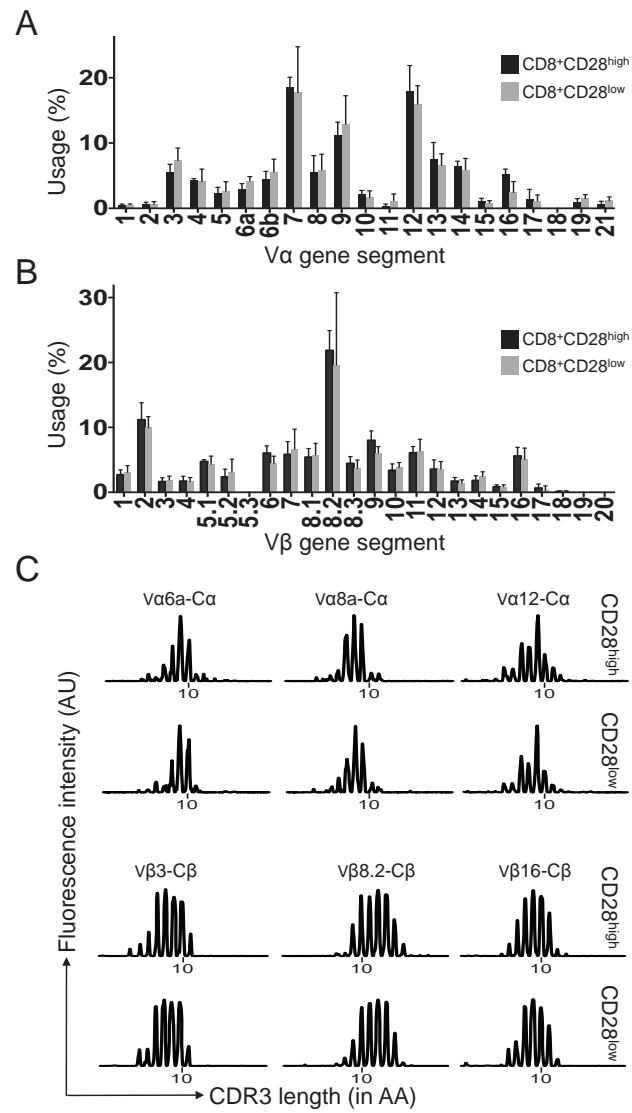


Fig. 5

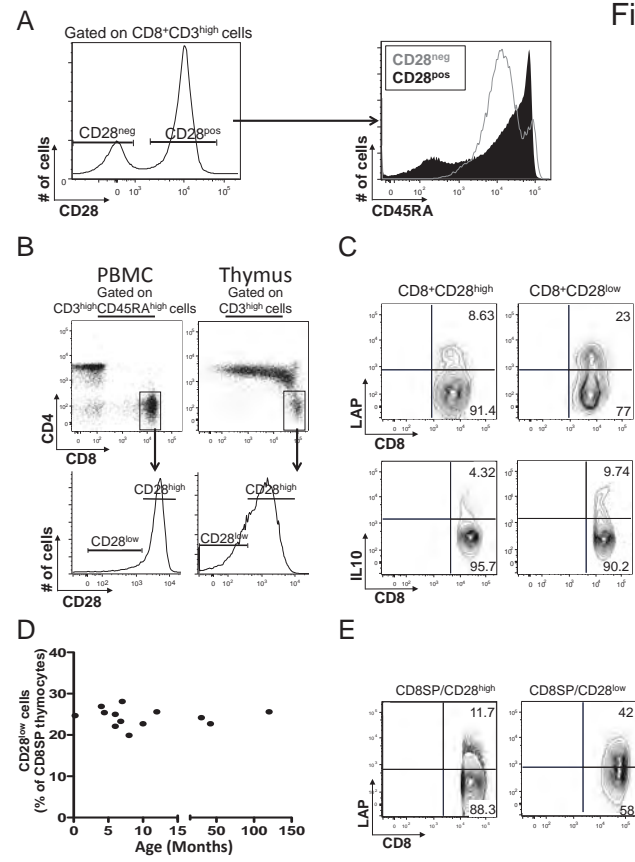


Table I. *Proportion of cytokine-producing cells among human CD8<sup>+</sup> T cell subsets*

	% of LAP among		% of IL10 among	
	CD8 <sup>+</sup> CD28 <sup>high</sup>	CD8 <sup>+</sup> CD28 <sup>low</sup>	CD8 <sup>+</sup> CD28 <sup>high</sup>	CD8 <sup>+</sup> CD28 <sup>low</sup>
<i>PBMC</i>				
donor 1	8.6	23.0	4.3	9.7
donor 2	5.4	10.2	4.0	8.5
donor 3	20.5	31.4	0.3	4.1
<i>Thymus</i>				
sample 1	11.7	42.0	n.d	n.d
sample 2	3.0	7.0	n.d	n.d
sample 3	7.4	16.3	n.d	n.d

n.d : not done

# IL-10 producing CD8<sup>+</sup>CD28<sup>low</sup> regulatory T cells control allergic airway responses

Yirajen Vuddamalay<sup>1,2,3</sup>, Nicolas Thiault<sup>1,2,3</sup>, Magali Savignac<sup>1,2,3</sup>, Geneviève Enault<sup>1,2,3</sup>, Axel Roers<sup>4</sup>, Ichiro Taniuchi<sup>5</sup>, Olivier Joffre<sup>1,2,3</sup>, Paola Romagnoli<sup>1,2,3</sup>,  
Lucette Pelletier<sup>1,2,3</sup> and Joost P.M. van Meerwijk<sup>1,2,3</sup>

<sup>1</sup>Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (Inserm), U1043, Toulouse, F-31300, France; <sup>2</sup>Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS), U5282, Toulouse, F-31300, France; and <sup>3</sup>Université de Toulouse, Université Paul Sabatier, Centre de Physiopathologie de Toulouse Purpan (CPTP), Toulouse, F-31300, France; <sup>4</sup>Institute of Immunology, Medical Faculty "Carl Gustav Carus", Dresden, Germany; <sup>5</sup>Research Center for Allergy and Immunology, RIKEN, Yokohama, Japan

Corresponding author:

Prof. Joost P.M. van Meerwijk, PhD., Inserm U1043, BP 3028, 31024, Toulouse Cedex 3, France, Phone +33 562 748381, FAX +33 562 744558, E-mail [Joost.van-Meerwijk@inserm.fr](mailto:Joost.van-Meerwijk@inserm.fr)

Abbreviations used:

## Abstract

Control of immune responses at environmental interfaces by regulatory T cells (Treg) is essential to limit the development of immune-mediated pathology such as inflammatory bowel diseases and allergic asthma. While the role of CD4<sup>+</sup> Treg populations has been established, the implication of CD8<sup>+</sup> Treg is little understood. Here we evaluated the relevance of CD8<sup>+</sup> Treg in the control of allergic airway responses. We used a conditional knockout approach to generate mice bearing specific ablation of IL-10, a key molecule involved in the control of immune responses at mucosal surfaces, in CD8<sup>+</sup> T cells. Absence of IL-10 production by CD8<sup>+</sup> Treg did not lead to noticeable signs of inflammation or autoimmunity in unmanipulated animals. However, in an experimental model of asthma, these mice developed exaggerated airway inflammation. Importantly, adoptive transfer of IL10-proficient CD8<sup>+</sup>CD28<sup>low</sup> Treg was sufficient to restrain the allergic reaction. Combined, our data show that IL-10 producing CD8<sup>+</sup> Treg control allergic responses in the lungs.

## Introduction

Tolerance to self and non-self antigens is the *sine qua non* for the prevention of immunopathologies such as autoimmunity, chronic inflammation and rejection of organ transplant. Regulatory T cells (Treg) play a critical role in maintaining this state of immunological balance. So far, the most extensively studied Treg population is a subset of T cells that expresses the CD4 coreceptor and the forkhead/winged helix transcription factor Foxp3 (1). In mice, specific ablation of Foxp3<sup>+</sup> T cells leads to the development of a fatal lymphoproliferative disorder (2) and in humans mutations in the gene encoding Foxp3 lead to the lethal Immune-dysfunction Polyendocrinopathy X linked syndrome (IPEX, (3)). These findings emphasize the essential role of Foxp3-expressing T cells as immune regulators. However, several other subsets of CD4 as well as CD8-expressing T cells endowed with immunosuppressive capacities have been described in both humans and mice. Recent studies have attributed essential non-redundant roles in the maintenance of immune homeostasis to these populations (4, 5). CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> Treg share common features in terms of development (6, 7) and effector mechanisms such as the production of the immunomodulatory cytokines IL-10 and TGF- $\beta$  (8-10). Importantly, defects in both CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> Treg subsets have been reported in autoimmune diseases and immune-mediated inflammatory pathologies (11-13).

Allergic asthma is a chronic inflammatory disorder associated with various degrees of airflow obstruction and airway hyperresponsiveness (AHR). In genetically predisposed subjects, asthma episodes are triggered by the inhalation of various environmental allergens such as pollen, fungal spores and house dust mites (HDM). Allergens are composed of proteases and different pathogen-associated-molecular-patterns (PAMP) that will recognize their corresponding receptors on airway

epithelial cells (AEC). This interaction leads to the secretion of cytokines such as TSLP, IL-25, and IL-33, which contribute to the maturation of dendritic cells (DC) and the conditioning of these antigen-presenting cells to induce a type-2 immune response against the sensitizing allergen. Hallmarks of asthma include massive airway infiltration by eosinophils, mast cells and activated Th2 cells, bronchoconstriction, mucus secretion and tissue remodeling.

Asthma patients have lower levels of IL-10 in their bronchoalveolar lavage fluid (BALF) compared to healthy individuals and there is an inverse association between IL-10 levels and the severity of allergic and asthmatic diseases (14-16). Furthermore, forced expression of IL-10 in the lungs efficiently blocks allergic airway inflammation in mice (17). Collectively, these data indicate an important role of IL-10 in the control of allergic responses. Since asthma is an immune-mediated disease, much attention has been drawn to the potential role of IL10-producing Treg in the control of this pathology. High frequencies of allergen-specific Th2 cells are present in asthmatic patients while in healthy individuals IL10-producing Type-1-regulatory (Tr1) CD4<sup>+</sup> T cells represent the dominant allergen-specific subset (18). Moreover, adoptive transfer of *IL10*-transfected CD4<sup>+</sup> T cells prevents allergen-induced airway hyperreactivity and inflammation (19). Recently, Rubtsov and colleagues have shown that the production of IL-10 by Foxp3<sup>+</sup> Treg limits ovalbumin (OVA)-induced inflammation in an experimental model of asthma. Combined, these data strongly suggest that CD4<sup>+</sup> Treg-derived IL-10 controls allergic responses in the lungs (20).

Several IL10-producing CD8<sup>+</sup> Treg have been described (8). Murine CD8<sup>+</sup>CD122<sup>high</sup> Treg efficiently suppress pathology in experimental models of colitis and autoimmune encephalomyelitis in an IL-10 dependent manner (4, 21, 22). We have previously reported that a subset of CD8<sup>+</sup> T cells characterized by the expression of low levels of

the co-stimulatory molecule CD28 prevents the development of intestinal bowel disease (IBD) in mice (7, 23). This protection required IL-10 production by the CD8<sup>+</sup>CD28<sup>low</sup> Treg (23). Control of delayed type hypersensitivity reactions by human CD8<sup>+</sup>CD45RO<sup>+</sup> is partly mediated by IL-10 (24). However, the role of IL10-producing CD8<sup>+</sup> Treg in asthma is poorly understood. We therefore evaluated the physiological relevance of CD8<sup>+</sup> Treg-derived IL-10 in the control of allergic airway inflammation.



## Materials and Methods

### *Mice*

Mice were used at 6 to 10 weeks of age. To generate the E8I-Cre/*Il10*<sup>fl/fl</sup> mice, B6 E8I-Cre mice (25) were crossed with B6 *Il10*<sup>fl/fl</sup> mice (26). B6 Thy1.1, B6 Rag<sup>o</sup> and B6 E8I-Cre/*Il10*<sup>fl/fl</sup> mice were bred in our SPF animal facility. All experiments involving animals were performed in compliance with the relevant laws and institutional guidelines (Regional approval # 31 09 555 45, ethical review # MP/08/14/02/12).

### *Flow cytometry analysis*

The following reagents were used: anti-B220-PerCP-Cy5.5 ; anti-CD8a-AF700; anti-CD11c-PeCy7; anti-CD24-eF450; anti-CD28-biotin; anti-TCRb-allophycocyanin ; anti-F4/80-APC-eF780 ; streptavidin-PE, all from eBiosciences (San Diego, CA); anti-CD4-Pacific Blue; anti-Sirp $\alpha$ -PE ; all from BD-Pharmingen (Heidelberg, Germany). Cells were incubated with saturating levels of antibodies. Thus labeled cells were analyzed on a FACS LSRII (Becton Dickinson, Pont de Claix, France) using DIVA (Becton Dickinson) and FlowJo software (Tree Star, Ashland, OR).

### *Isolation of Treg*

Splenic CD8<sup>+</sup>CD28<sup>low</sup> Treg were isolated as previously described (23).

### *Bone marrow chimeras*

Bone marrow from femurs and tibias were prepared as previously described (27). 5.10<sup>6</sup> donor cells were then injected intravenously into  $\gamma$ -irradiated hosts (8.5 Gy g; <sup>137</sup>Cs source, 6.3 Gy/min) that were kept on antibiotic-containing water (0.28%

pediatric suspension of Bactrim<sup>®</sup>, Roche, Basel, Switzerland) for the complete duration of the experiment.

#### *Induction of allergic lung inflammation*

Mice received one injection of 100µg of OVA (Sigma-Aldrich, Saint-Quentin Fallavier, France) complexed with aluminium hydroxide (alum, Sigma-Aldrich) in 250µl of phosphate-buffered saline (PBS). The animals were then challenged 14 days later through intranasal route (i.n.) with 50µg of OVA in 50µl of PBS for 5 days. Control groups were challenged i.n. with 50µl of PBS. Bronchio-alveolar lavage (BAL) was collected by cannulation of the trachea and lavage with phosphate-buffered saline. Cells were then analyzed by flow-cytometry or as described previously (28).

#### *IgE antibody measurement*

Serum were processed and frozen at -80°C until analysis. The level of total IgE in the serum was determined by enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) using an ELISA kit (Ebioscience). Measurements were performed according to the manufactures' instructions.

#### *Real-Time PCR*

Total RNA was isolated from a section of the left lung with an RNeasy mini kit (QIAGEN), and mRNA amounts for IL-4, IL-5, IL-13, CXCL1, and GAPDH were determined by quantitative PCR on a LC480 instrument (Roche) using primers described previously (29, 30).

### *Histological analysis*

Samples of colon, ileum, liver and lungs were fixed in 10% buffered formol. Parrafin-embedded sections (5µm) were cut and stained either with H&E or Alcian Blue (mucin staining). Lung pathology evaluation based on the magnitude of total inflammatory cell infiltrate was performed in a blinded fashion.

### *Statistical analysis*

Statistical significance was determined using the Mann-Whitney test.

## Results

### *Specific ablation of IL-10 production by CD8<sup>+</sup> T cells does not lead to spontaneous disease*

To restrict IL-10 deficiency to the CD8<sup>+</sup> compartment, we crossed mice expressing the Cre recombinase under control of the E8I enhancer and the *Cd8a* promoter (E8I-Cre) with mice in which loxP sites flank the first exon of the *Il10* gene (*Il10<sup>fl/fl</sup>*). The E8I-Cre transgene includes a sequence encoding an internal ribosomal entry site and GFP, which allows the monitoring of its expression. In E8I-Cre/*Il10<sup>fl/fl</sup>* mice, GFP was expressed neither in immature CD4/CD8 “double positive (DP) thymocytes nor in mature CD4<sup>+</sup> T cells in the thymus or spleen (Fig. 1A). Whereas mature CD8<sup>+</sup> T cells expressed GFP, CD8α-expressing DC did not (Fig. 1A). These data show that IL-10 deficiency in E8I-Cre/*Il10<sup>fl/fl</sup>* mice is restricted to mature CD8<sup>+</sup> T cells.

In unmanipulated E8I-Cre/*Il10<sup>fl/fl</sup>* mice we did not observe any symptoms of immune dysfunction up to one year after birth: Histological analysis of various organs including liver, lung, colon and small intestine from these animals revealed no apparent signs of inflammation or tissue damage (Fig. 1C). These data show that IL-10 production by CD8<sup>+</sup> T cells is not required to prevent systemic autoimmunity and inflammation in laboratory mice.

### *In absence of IL-10 production by CD8α<sup>+</sup> cells, mice display enhanced OVA-induced lung inflammation*

IL-10 plays a critical role in maintaining immune homeostasis at environmental interfaces (31, 32). We therefore investigated the potential role of CD8<sup>+</sup> Treg-derived IL-10 in the regulation of airway immune responses in an experimental model of asthma. In this model, lung inflammation is induced through immunization and

subsequent intranasal challenge with OVA. Compared to their littermate controls, E8I-Cre/*Il10*<sup>fl/fl</sup> mice showed higher serum IgE levels (Fig. 2A). We also observed augmented airway inflammation with a 2-to-3-fold increase in the number of eosinophils, T cells and monocytes/macrophages in their BALF (Fig. 2B). Histological analysis of lung sections revealed increased periarteriolar cellular infiltrates (Fig. 2C) and blinded histologic grading of pathology revealed a two-fold increased clinical score in E8I-Cre/*Il10*<sup>fl/fl</sup> mice as compared to E8I-Cre/*Il10*<sup>fl/fl</sup> littermate controls (Fig. 2D). mRNA levels of Th2 cytokines and the T-cell chemoattractant neurotactin (CXCL1) was also substantially and significantly higher in the lungs of E8I-Cre/*Il10*<sup>fl/fl</sup> animals (Fig. 2E). Together, our data show that IL-10 secretion by CD8<sup>+</sup> T cells is involved in the control of immune responses in the lungs.

*Defect in IL-10 production by CD8<sup>+</sup> T cells accounts for augmented allergic responses in E8I-Cre/*Il10*<sup>fl/fl</sup> mice*

DC have been described to upregulate CD8 $\alpha$  expression upon activation by for example TLR agonists (33). Such transient CD8 $\alpha$  expression cannot be monitored through GFP expression due to the short half-life of the fluorescent protein. Importantly, production of IL10 by pulmonary DC upon respiratory antigen encounter has been shown to be involved in the induction of tolerance in the airway (34). Thus, during asthma induction in E8I-Cre/*Il10*<sup>fl/fl</sup> mice, possible upregulation of CD8 $\alpha$  could have led to deletion of *Il10* in specific subsets of DC and account for augmented allergic responses in these animals. To distinguish between DC and CD8<sup>+</sup> T cells involvement, we generated mixed bone marrow (BM) chimeras to restrict *Il10* deficiency to CD8<sup>+</sup> T cells. Lethally irradiated E8I-Cre/*Il10*<sup>fl/fl</sup> mice were reconstituted with BM from B6 Rag<sup>o</sup> mice and E8I-Cre/*Il10*<sup>fl/fl</sup> mice in a 9:1 ratio

(‘Cre<sup>+</sup>→Cre<sup>+</sup>’ chimeras). In these animals, most of the DC will differentiate from the Rag<sup>o</sup> BM precursors and will be IL-10 proficient. However, T cells will only be able to differentiate from the other BM and will thus exhibit specific ablation of *IL10* in the CD8<sup>+</sup> T cell compartment. E8I-Cre/*Il10*<sup>fl/fl</sup> littermate controls were used to generate the control group (‘Cre<sup>-</sup>→Cre<sup>+</sup>’ chimeras). Eight weeks after reconstitution, experimental allergic asthma was induced in these animals. ‘Cre<sup>-</sup>→Cre<sup>+</sup>’ chimeras exhibited higher blood serum IgE level (Fig. 3A) as well as BALF cellularity (Fig. 3B) than the control ‘Cre<sup>-</sup>→Cre<sup>+</sup>’ chimeras. Histological analysis revealed massive cellular infiltration in the lungs of ‘Cre<sup>+</sup>→Cre<sup>+</sup>’ chimeras (Fig. 3C). Importantly, this level of exaggerated inflammation was comparable with E8I-Cre/*Il10*<sup>fl/fl</sup> mice. Also, we did not observe any significant differences between the control groups (Fig. 3A-C). Combined, our data demonstrate that one or several CD8<sup>+</sup> T cell populations control experimental allergic asthma (at least in part) by producing IL-10.

#### *CD8<sup>+</sup>CD28<sup>low</sup> Treg limit experimental allergic asthma*

Several IL-10 producing CD8<sup>+</sup> Treg populations have been described. We next tested if CD8<sup>+</sup>CD28<sup>low</sup> Treg, which prevent experimental colitis in an IL-10 dependent manner, can control experimental allergic asthma. To this end, we transferred naïve wild-type (wt) CD8<sup>+</sup>CD28<sup>low</sup> Treg to E8I-Cre/*Il10*<sup>fl/fl</sup> mice prior to OVA immunization. Upon asthma induction, E8I-Cre/*Il10*<sup>fl/fl</sup> mice transferred with CD8<sup>+</sup>CD28<sup>low</sup> Treg showed marked reduction in serum IgE levels (Fig. 3A) and lung infiltrates (Fig. 3B) as compared to mutant mice which did not receive any cell transfer or to littermate controls. Combined, these data show that partial reconstitution of the IL10-producing CD8<sup>+</sup> Treg compartment with wt CD8<sup>+</sup>CD28<sup>low</sup> Treg is sufficient to limit allergen-induced lung inflammation in E8I-Cre/*Il10*<sup>fl/fl</sup> mice.

## Discussion

In this report, we address the relevance of IL-10 production by CD8<sup>+</sup> Treg in the control of allergic asthma. Specific deletion of *Il10* in CD8<sup>+</sup> Treg led to no apparent symptoms of spontaneous autoimmune or inflammatory disorders in laboratory mice. However, mice harboring this deletion exhibited augmented allergen-induced airway inflammation as compared to their littermate controls. We also show that the adoptive transfer of IL10-sufficient CD8<sup>+</sup>CD28<sup>low</sup> Treg in these mutant animals limits the lung inflammation. Our results therefore indicate that CD8<sup>+</sup> Treg are an essential source of IL-10 involved in the control of immune responses to respiratory allergens.

IL-10 is a major regulator of both innate and adaptive immune responses. Its importance in immune modulation is highlighted by the phenotype of IL-10 deficient mice that develop spontaneous colitis due to uncontrolled responses to normal gut flora (35). These mice are also more susceptible to pathogen-induced immunopathologies (36) and exhibit enhanced cutaneous inflammatory responses (37). IL-10 is produced by a variety of immune cells including monocytes/macrophages (38-40), NK cells (40, 41), neutrophils (39, 42), eosinophils, DC (43), B (44, 45), CD4<sup>+</sup> (46-51) and CD8<sup>+</sup> (4, 8, 21, 23) T cells. IL-10 exerts its anti-inflammatory effects particularly by inhibiting the functions of antigen-presenting cells and limiting the production of pro-inflammatory cytokines and other mediators of inflammation (31, 32).

During immune responses to allergens, pleiotropic anti-inflammatory effects of IL-10 potentially range from the inactivation of APC (52-56), the inhibition of cytokine production by eosinophils and mast cells (57, 58) to the modulation of IgE/IgG production by B cells (59, 60). IL-10 production by pulmonary DC, Tr1 cells and Foxp3<sup>+</sup> Treg has been shown to be involved in the induction of tolerance to

respiratory antigens (20, 34, 61). Here we identified CD8<sup>+</sup>CD28<sup>low</sup> Treg (which do not express Foxp3) as a novel source of the IL-10 involved in the maintenance of immune homeostasis in the airways. The fact that there is no compensatory effect by IL-10 derived from other cell types in E8I-Cre x *Il10*<sup>fl/fl</sup> mice attributes complex non-redundant roles to the various IL10-producing myeloid and lymphoid populations in the control of allergic asthma.

Unexpectedly, adoptive transfer of only one subset of CD8<sup>+</sup> Treg, namely CD8<sup>+</sup>CD28<sup>low</sup> Treg, was sufficient to limit lung inflammation in E8I-Cre/*Il10*<sup>fl/fl</sup> mice. We have previously shown that this Treg population exerts suppressive function *in vitro* and controls experimental colitis *in vivo* (23). Recently, our group has identified a homologous naïve CD8<sup>+</sup>CD28<sup>low</sup> T cell population with immunosuppressive properties in human peripheral blood and thymus (Vuddamalay *et al.* submitted). The present report firmly establishes the potent capacity of CD8<sup>+</sup>CD28<sup>low</sup> Treg to regulate immune responses. It will therefore be important to evaluate the ability of this population to control other immune responses as well as its possible defects in human immune-mediated diseases.

Studies on the functional significance of CD8<sup>+</sup> Treg in immune-mediated diseases have been impeded by the lack of characteristic markers allowing for the specific depletion of these cells *in vivo*. Up till now, we and others have resorted to the use of adoptive transfer models such as experimental colitis and *in vitro* functional assays to demonstrate the suppressive nature of a given CD8<sup>+</sup> Treg population. Here we show that *in vivo* disruption of a single effector mechanism of CD8<sup>+</sup> Treg leads to an increased susceptibility to an immune-mediated disease. Indeed, the remaining unaltered array of effector functions of CD8<sup>+</sup> Treg, including the production of TGF-β, could not avert pathology in E8I-Cre/*Il10*<sup>fl/fl</sup> mice. Our work thus substantially



strengthens the conclusion that CD8<sup>+</sup> Treg utilize distinct non-redundant suppressor mechanisms to regulate immune responses.

In conclusion, our data show that CD8<sup>+</sup> Treg regulate airway immune responses in an IL-10 dependent manner. It will now be important to expand this study to other models of immunopathologies and autoimmunity so as to fully decipher the role of CD8<sup>+</sup> Treg in the control of immune homeostasis.

## Acknowledgements

We thank Fatima-Ezzahra L'Faqihi-Olive, Valérie Duplan-Eche and Manon Farce (Inserm U1043 flow cytometry facility) and the personnel of the Inserm/UPS US006 CREFRE animal facility for expert technical assistance; Dr. Andreas Thiel (Charité, Berlin) for kindly providing E81-Cre mice. This work was financially supported by grants from the Association François Aupetit ( 2013 and 2014); the Ligue contre le cancer (to Y.V.) and the Foundation ARC pour la recherche sur le cancer.

## References

1. Cretney, E., A. Kallies, and S. L. Nutt. 2013. Differentiation and function of Foxp3(+) effector regulatory T cells. *Trends Immunol* 34: 74-80.
2. Brunkow, M. E., E. W. Jeffery, K. A. Hjerrild, B. Paeper, L. B. Clark, S. A. Yasayko, J. E. Wilkinson, D. Galas, S. F. Ziegler, and F. Ramsdell. 2001. Disruption of a new forkhead/winged-helix protein, scurf, results in the fatal lymphoproliferative disorder of the scurfy mouse. *Nat Genet* 27: 68-73.
3. Bennett, C. L., J. Christie, F. Ramsdell, M. E. Brunkow, P. J. Ferguson, L. Whitesell, T. E. Kelly, F. T. Saulsbury, P. F. Chance, and H. D. Ochs. 2001. The immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X-linked syndrome (IPEX) is caused by mutations of FOXP3. *Nat Genet* 27: 20-21.
4. Endharti, A. T., Y. Okuno, Z. Shi, N. Misawa, S. Toyokuni, M. Ito, K. Isobe, and H. Suzuki. 2011. CD8+CD122+ regulatory T cells (Tregs) and CD4+ Tregs cooperatively prevent and cure CD4+ cell-induced colitis. *J Immunol* 186: 41-52.
5. Hall, B. M., N. D. Verma, G. T. Tran, and S. J. Hodgkinson. 2011. Distinct regulatory CD4+T cell subsets; differences between naive and antigen specific T regulatory cells. *Curr Opin Immunol* 23: 641-647.
6. Malchow, S., D. S. Leventhal, S. Nishi, B. I. Fischer, L. Shen, G. P. Paner, A. S. Amit, C. Kang, J. E. Geddes, J. P. Allison, N. D. Socci, and P. A. Savage. 2013. Aire-dependent thymic development of tumor-associated regulatory T cells. *Science* 339: 1219-1224.
7. Pomie, C., R. Vicente, Y. Vuddamalay, B. A. Lundgren, M. van der Hoek, G. Enault, J. Kagan, N. Fazilleau, H. S. Scott, P. Romagnoli, and J. P. van

- Meerwijk. 2011. Autoimmune regulator (AIRE)-deficient CD8<sup>+</sup>CD28<sup>low</sup> regulatory T lymphocytes fail to control experimental colitis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108: 12437-12442.
8. Pomie, C., I. Menager-Marcq, and J. P. van Meerwijk. 2008. Murine CD8<sup>+</sup> regulatory T lymphocytes: the new era. *Hum Immunol* 69: 708-714.
  9. Pot, C., L. Apetoh, and V. K. Kuchroo. 2011. Type 1 regulatory T cells (Tr1) in autoimmunity. *Semin Immunol* 23: 202-208.
  10. Vignali, D. A., L. W. Collison, and C. J. Workman. 2008. How regulatory T cells work. *Nat Rev Immunol* 8: 523-532.
  11. Buckner, J. H. 2010. Mechanisms of impaired regulation by CD4(+)CD25(+)FOXP3(+) regulatory T cells in human autoimmune diseases. *Nat Rev Immunol* 10: 849-859.
  12. Joosten, S. A., and T. H. Ottenhoff. 2008. Human CD4 and CD8 regulatory T cells in infectious diseases and vaccination. *Hum Immunol* 69: 760-770.
  13. Filaci, G., D. Fenoglio, and F. Indiveri. 2011. CD8(+) T regulatory/suppressor cells and their relationships with autoreactivity and autoimmunity. *Autoimmunity* 44: 51-57.
  14. Borish, L., A. Aarons, J. Rumbyrt, P. Cvietusa, J. Negri, and S. Wenzel. 1996. Interleukin-10 regulation in normal subjects and patients with asthma. *J Allergy Clin Immunol* 97: 1288-1296.
  15. Lim, S., E. Crawley, P. Woo, and P. J. Barnes. 1998. Haplotype associated with low interleukin-10 production in patients with severe asthma. *Lancet* 352: 113.
  16. Heaton, T., J. Rowe, S. Turner, R. C. Aalberse, N. de Klerk, D. Suriyaarachchi, M. Serralha, B. J. Holt, E. Hollams, S. Yerkovich, K. Holt, P.

- D. Sly, J. Goldblatt, P. Le Souef, and P. G. Holt. 2005. An immunoepidemiological approach to asthma: identification of in-vitro T-cell response patterns associated with different wheezing phenotypes in children. *Lancet* 365: 142-149.
17. Stampfli, M. R., M. Cwiartka, B. U. Gajewska, D. Alvarez, S. A. Ritz, M. D. Inman, Z. Xing, and M. Jordana. 1999. Interleukin-10 gene transfer to the airway regulates allergic mucosal sensitization in mice. *American journal of respiratory cell and molecular biology* 21: 586-596.
  18. Akdis, M., J. Verhagen, A. Taylor, F. Karamloo, C. Karagiannidis, R. Cramer, S. Thunberg, G. Deniz, R. Valenta, H. Fiebig, C. Kegel, R. Disch, C. B. Schmidt-Weber, K. Blaser, and C. A. Akdis. 2004. Immune responses in healthy and allergic individuals are characterized by a fine balance between allergen-specific T regulatory 1 and T helper 2 cells. *J Exp Med* 199: 1567-1575.
  19. Oh, J. W., C. M. Seroogy, E. H. Meyer, O. Akbari, G. Berry, C. G. Fathman, R. H. Dekruyff, and D. T. Umetsu. 2002. CD4 T-helper cells engineered to produce IL-10 prevent allergen-induced airway hyperreactivity and inflammation. *J Allergy Clin Immunol* 110: 460-468.
  20. Rubtsov, Y. P., J. P. Rasmussen, E. Y. Chi, J. Fontenot, L. Castelli, X. Ye, P. Treuting, L. Siewe, A. Roers, W. R. Henderson, Jr., W. Muller, and A. Y. Rudensky. 2008. Regulatory T cell-derived interleukin-10 limits inflammation at environmental interfaces. *Immunity* 28: 546-558.
  21. Endharti, A. T., I. M. Rifa, Z. Shi, Y. Fukuoka, Y. Nakahara, Y. Kawamoto, K. Takeda, K. Isobe, and H. Suzuki. 2005. Cutting edge: CD8<sup>+</sup>CD122<sup>+</sup>

regulatory T cells produce IL-10 to suppress IFN-gamma production and proliferation of CD8<sup>+</sup> T cells. *J Immunol* 175: 7093-7097.

22. Lee, Y. H., Y. Ishida, M. Rifa'i, Z. Shi, K. Isobe, and H. Suzuki. 2008. Essential role of CD8<sup>+</sup>CD122<sup>+</sup> regulatory T cells in the recovery from experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Immunol* 180: 825-832.
23. Menager-Marcq, I., C. Pomie, P. Romagnoli, and J. P. van Meerwijk. 2006. CD8<sup>+</sup>CD28<sup>-</sup> regulatory T lymphocytes prevent experimental inflammatory bowel disease in mice. *Gastroenterology* 131: 1775-1785.
24. Wei, S., I. Kryczek, L. Zou, B. Daniel, P. Cheng, P. Mottram, T. Curiel, A. Lange, and W. Zou. 2005. Plasmacytoid dendritic cells induce CD8<sup>+</sup> regulatory T cells in human ovarian carcinoma. *Cancer Res* 65: 5020-5026.
25. Maekawa, Y., Y. Minato, C. Ishifune, T. Kurihara, A. Kitamura, H. Kojima, H. Yagita, M. Sakata-Yanagimoto, T. Saito, I. Taniuchi, S. Chiba, S. Sone, and K. Yasutomo. 2008. Notch2 integrates signaling by the transcription factors RBP-J and CREB1 to promote T cell cytotoxicity. *Nat Immunol* 9: 1140-1147.
26. Roers, A., L. Siewe, E. Strittmatter, M. Deckert, D. Schluter, W. Stenzel, A. D. Gruber, T. Krieg, K. Rajewsky, and W. Muller. 2004. T cell-specific inactivation of the interleukin 10 gene in mice results in enhanced T cell responses but normal innate responses to lipopolysaccharide or skin irritation. *J Exp Med* 200: 1289-1297.
27. Joffre, O., N. Gorsse, P. Romagnoli, D. Hudrisier, and J. P. van Meerwijk. 2004. Induction of antigen-specific tolerance to bone marrow allografts with CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T lymphocytes. *Blood* 103: 4216-4221.

28. Henderson, W. R., Jr., D. B. Lewis, R. K. Albert, Y. Zhang, W. J. Lamm, G. K. Chiang, F. Jones, P. Eriksen, Y. T. Tien, M. Jonas, and E. Y. Chi. 1996. The importance of leukotrienes in airway inflammation in a mouse model of asthma. *J Exp Med* 184: 1483-1494.
29. Donnelly, D. J., E. E. Longbrake, T. M. Shawler, K. A. Kigerl, W. Lai, C. A. Tovar, R. M. Ransohoff, and P. G. Popovich. 2011. Deficient CX3CR1 signaling promotes recovery after mouse spinal cord injury by limiting the recruitment and activation of Ly6Clo/iNOS<sup>+</sup> macrophages. *J Neurosci* 31: 9910-9922.
30. Overbergh, L., A. Giulietti, D. Valckx, R. Decallonne, R. Bouillon, and C. Mathieu. 2003. The use of real-time reverse transcriptase PCR for the quantification of cytokine gene expression. *Journal of biomolecular techniques : JBT* 14: 33-43.
31. Moore, K. W., R. de Waal Malefyt, R. L. Coffman, and A. O'Garra. 2001. Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor. *Annu Rev Immunol* 19: 683-765.
32. Sabat, R., G. Grutz, K. Warszawska, S. Kirsch, E. Witte, K. Wolk, and J. Geginat. 2010. Biology of interleukin-10. *Cytokine Growth Factor Rev* 21: 331-344.
33. Brown, A. S., D. Bourges, D. K. Ang, E. L. Hartland, and I. R. van Driel. 2014. CD8 subunit expression by plasmacytoid dendritic cells is variable, and does not define stable subsets. *Mucosal Immunol* 7: 200-201.
34. Akbari, O., R. H. DeKruyff, and D. T. Umetsu. 2001. Pulmonary dendritic cells producing IL-10 mediate tolerance induced by respiratory exposure to antigen. *Nat Immunol* 2: 725-731.

35. Kuhn, R., J. Lohler, D. Rennick, K. Rajewsky, and W. Muller. 1993. Interleukin-10-deficient mice develop chronic enterocolitis. *Cell* 75: 263-274.
36. Gazzinelli, R. T., M. Wysocka, S. Hieny, T. Scharton-Kersten, A. Cheever, R. Kuhn, W. Muller, G. Trinchieri, and A. Sher. 1996. In the absence of endogenous IL-10, mice acutely infected with *Toxoplasma gondii* succumb to a lethal immune response dependent on CD4<sup>+</sup> T cells and accompanied by overproduction of IL-12, IFN-gamma and TNF-alpha. *J Immunol* 157: 798-805.
37. Berg, D. J., M. W. Leach, R. Kuhn, K. Rajewsky, W. Muller, N. J. Davidson, and D. Rennick. 1995. Interleukin 10 but not interleukin 4 is a natural suppressant of cutaneous inflammatory responses. *J Exp Med* 182: 99-108.
38. Chomarat, P., M. C. Rissoan, J. Banchereau, and P. Miossec. 1993. Interferon gamma inhibits interleukin 10 production by monocytes. *J Exp Med* 177: 523-527.
39. Siewe, L., M. Bollati-Fogolin, C. Wickenhauser, T. Krieg, W. Muller, and A. Roers. 2006. Interleukin-10 derived from macrophages and/or neutrophils regulates the inflammatory response to LPS but not the response to CpG DNA. *Eur J Immunol* 36: 3248-3255.
40. Seki, S., S. Osada, S. Ono, S. Aosasa, Y. Habu, T. Nishikage, H. Mochizuki, and H. Hiraide. 1998. Role of liver NK cells and peritoneal macrophages in gamma interferon and interleukin-10 production in experimental bacterial peritonitis in mice. *Infect Immun* 66: 5286-5294.
41. Mehrotra, P. T., R. P. Donnelly, S. Wong, H. Kanegane, A. Geremew, H. S. Mostowski, K. Furuke, J. P. Siegel, and E. T. Bloom. 1998. Production of IL-



- 10 by human natural killer cells stimulated with IL-2 and/or IL-12. *J Immunol* 160: 2637-2644.
42. Zhang, X., L. Majlessi, E. Deriaud, C. Leclerc, and R. Lo-Man. 2009. Coactivation of Syk kinase and MyD88 adaptor protein pathways by bacteria promotes regulatory properties of neutrophils. *Immunity* 31: 761-771.
43. Blanco, P., A. K. Palucka, V. Pascual, and J. Banchereau. 2008. Dendritic cells and cytokines in human inflammatory and autoimmune diseases. *Cytokine Growth Factor Rev* 19: 41-52.
44. Yanaba, K., J. D. Bouaziz, T. Matsushita, T. Tsubata, and T. F. Tedder. 2009. The development and function of regulatory B cells expressing IL-10 (B10 cells) requires antigen receptor diversity and TLR signals. *J Immunol* 182: 7459-7472.
45. Fillatreau, S., C. H. Sweeney, M. J. McGeachy, D. Gray, and S. M. Anderton. 2002. B cells regulate autoimmunity by provision of IL-10. *Nat Immunol* 3: 944-950.
46. Ahyi, A. N., H. C. Chang, A. L. Dent, S. L. Nutt, and M. H. Kaplan. 2009. IFN regulatory factor 4 regulates the expression of a subset of Th2 cytokines. *J Immunol* 183: 1598-1606.
47. Saraiva, M., J. R. Christensen, M. Veldhoen, T. L. Murphy, K. M. Murphy, and A. O'Garra. 2009. Interleukin-10 production by Th1 cells requires interleukin-12-induced STAT4 transcription factor and ERK MAP kinase activation by high antigen dose. *Immunity* 31: 209-219.
48. Groux, H., A. O'Garra, M. Bigler, M. Rouleau, S. Antonenko, J. E. de Vries, and M. G. Roncarolo. 1997. A CD4<sup>+</sup> T-cell subset inhibits antigen-specific T-cell responses and prevents colitis. *Nature* 389: 737-742.

49. Maynard, C. L., L. E. Harrington, K. M. Janowski, J. R. Oliver, C. L. Zindl, A. Y. Rudensky, and C. T. Weaver. 2007. Regulatory T cells expressing interleukin 10 develop from Foxp3<sup>+</sup> and Foxp3<sup>-</sup> precursor cells in the absence of interleukin 10. *Nat Immunol* 8: 931-941.
50. Vanden Eijnden, S., S. Goriely, D. De Wit, F. Willems, and M. Goldman. 2005. IL-23 up-regulates IL-10 and induces IL-17 synthesis by polyclonally activated naive T cells in human. *Eur J Immunol* 35: 469-475.
51. McGeachy, M. J., K. S. Bak-Jensen, Y. Chen, C. M. Tato, W. Blumenschein, T. McClanahan, and D. J. Cua. 2007. TGF-beta and IL-6 drive the production of IL-17 and IL-10 by T cells and restrain T(H)-17 cell-mediated pathology. *Nat Immunol* 8: 1390-1397.
52. Caux, C., C. Massacrier, B. Vanbervliet, C. Barthelemy, Y. J. Liu, and J. Banchereau. 1994. Interleukin 10 inhibits T cell alloreaction induced by human dendritic cells. *Int Immunol* 6: 1177-1185.
53. de Waal Malefyt, R., J. Haanen, H. Spits, M. G. Roncarolo, A. te Velde, C. Figdor, K. Johnson, R. Kastelein, H. Yssel, and J. E. de Vries. 1991. Interleukin 10 (IL-10) and viral IL-10 strongly reduce antigen-specific human T cell proliferation by diminishing the antigen-presenting capacity of monocytes via downregulation of class II major histocompatibility complex expression. *J Exp Med* 174: 915-924.
54. Enk, A. H., V. L. Angeloni, M. C. Udey, and S. I. Katz. 1993. Inhibition of Langerhans cell antigen-presenting function by IL-10. A role for IL-10 in induction of tolerance. *J Immunol* 151: 2390-2398.

55. Fiorentino, D. F., A. Zlotnik, P. Vieira, T. R. Mosmann, M. Howard, K. W. Moore, and A. O'Garra. 1991. IL-10 acts on the antigen-presenting cell to inhibit cytokine production by Th1 cells. *J Immunol* 146: 3444-3451.
56. Morel, A. S., S. Quaratino, D. C. Douek, and M. Londei. 1997. Split activity of interleukin-10 on antigen capture and antigen presentation by human dendritic cells: definition of a maturative step. *Eur J Immunol* 27: 26-34.
57. Royer, B., S. Varadaradjalou, P. Saas, J. J. Guillochon, J. P. Kantelip, and M. Arock. 2001. Inhibition of IgE-induced activation of human mast cells by IL-10. *Clin Exp Allergy* 31: 694-704.
58. Takanashi, S., R. Nonaka, Z. Xing, P. O'Byrne, J. Dolovich, and M. Jordana. 1994. Interleukin 10 inhibits lipopolysaccharide-induced survival and cytokine production by human peripheral blood eosinophils. *J Exp Med* 180: 711-715.
59. Jeannin, P., S. Lecoanet, Y. Delneste, J. F. Gauchat, and J. Y. Bonnefoy. 1998. IgE versus IgG4 production can be differentially regulated by IL-10. *J Immunol* 160: 3555-3561.
60. Nouri-Aria, K. T., P. A. Wachholz, J. N. Francis, M. R. Jacobson, S. M. Walker, L. K. Wilcock, S. Q. Staple, R. C. Aalberse, S. J. Till, and S. R. Durham. 2004. Grass pollen immunotherapy induces mucosal and peripheral IL-10 responses and blocking IgG activity. *J Immunol* 172: 3252-3259.
61. Wu, K., Y. Bi, K. Sun, and C. Wang. 2007. IL-10-producing type 1 regulatory T cells and allergy. *Cellular & molecular immunology* 4: 269-275.

## Figure legends

*Fig. 1. Lack of systemic autoimmunity in mice harboring specific deletion in CD8<sup>+</sup> T cells.*

(A) E8I-GFP expression by electronically gated single positive CD8<sup>+</sup>CD4<sup>-</sup> (CD8SP), single-positive CD4<sup>+</sup>CD8<sup>-</sup> (CD4SP) and double-positive CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> (DP) in the thymus (Left panel) and mature CD8<sup>+</sup> and CD4<sup>+</sup> T cells (CD8<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup>) in the spleen of E8I-Cre/*Il10*<sup>fl/fl</sup> mice (Right panel). (B) Gating strategy to analyze E8I-GFP expression by splenic CD8α<sup>+</sup> and CD8α<sup>-</sup> DC in E8I-Cre/*Il10*<sup>fl/fl</sup> mice. (C) Histological analysis of indicated organs from 12-month-old E8I-Cre/*Il10*<sup>fl/fl</sup> mice (CRE+) and their littermate control (CRE-) after staining with H&E or Alcian Blue (mucin staining). Data are representative of the three mice analyzed in each group.

*Fig. 2. Exaggerated pulmonary allergic responses in E8I-Cre/*Il10*<sup>fl/fl</sup> mice*

E8I-Cre/*Il10*<sup>fl/fl</sup> mice (CRE+) and littermate controls (CRE-) were immunized with OVA complexed with alum and then challenged i.n. 14 days later either with OVA (OVA) or PBS (PBS). (A) Total blood serum IgE levels from indicated groups. (B) BALF cellularity (Top panel) and constituent proportion (Right panel showing only the OVA-challenged animals) from indicated groups. (C) H&E staining of lung sections from indicated groups. Data is representative of the 4-5 mice analyzed in each group per experiment. (D) Lung pathology scoring based on histological analysis in (C). Sections were evaluated on a 0-4+ score. 4-5 mice per group were analyzed per experiment. (E) mRNA expression of CXCL1 and Th2-cytokines level in lungs of OVA-challenged animals. Data are presented as fold increase in expression as

compared to that in CRE- control animals. For A-B and D-E, pooled data from three independent experiments are shown.

*Fig. 3. Absence of IL-10 production by CD8<sup>+</sup>T cells leads to enhanced lung inflammation in E8I-Cre/Il10<sup>fl/fl</sup> mice*

Lethally irradiated E8I-Cre/Il10<sup>fl/fl</sup> mice were reconstituted with T-cell depleted BM from Rag<sup>o</sup> mice and E8I-Cre/Il10<sup>fl/fl</sup> (CRE+→CRE+) or from Rag<sup>o</sup> mice and E8I-Cre/Il10<sup>fl/fl</sup> littermate control (CRE-→CRE+) in a 9-to-1 ratio. Eight weeks after reconstitution, these chimeras, together with unmanipulated CRE+ and CRE- mice were subjected to experimental asthma as described in Fig. 2. Only the data from OVA-challenged animals are presented. (A) Total blood serum IgE levels from indicated groups (B) BALF cellularity from indicated groups. (C) H&E staining of lung sections from indicated groups. Data is representative of the 4-5 mice analyzed in each group in two independent experiments. For A-B, pooled data from two independent experiments are shown.

*Fig. 4. Adoptive transfer of IL10-proficient CD8<sup>+</sup>CD28<sup>low</sup> T cells restrains aberrant allergic responses in E8I-Cre/Il10<sup>fl/fl</sup> mice*

10<sup>7</sup> naïve CD8<sup>+</sup>CD28<sup>low</sup> T cells from B6 thy1.1 mice were adoptively transferred to E8I-Cre/Il10<sup>fl/fl</sup> mice (CRE+ + wt CD8<sup>+</sup>CD28<sup>low</sup> Treg) prior to immunization with OVA-alum. These mice together with other CRE+ and CRE- mice were subjected to OVA-induced lung inflammation. (A) H&E staining of lung sections from indicated groups. Data is representative of the 4-5 mice analyzed in each group in one experiment. (B) Total blood serum IgE levels from indicated groups (4-5 mice per group, n=1 experiment)

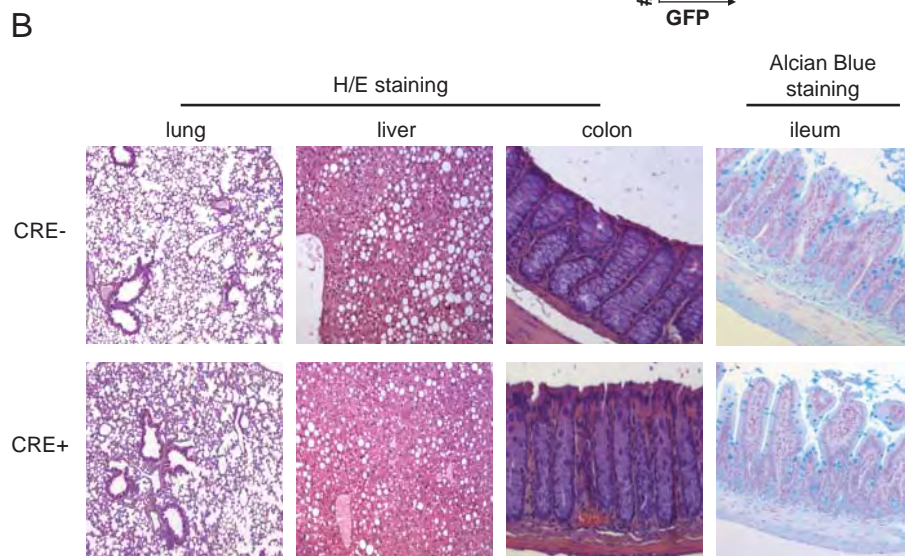
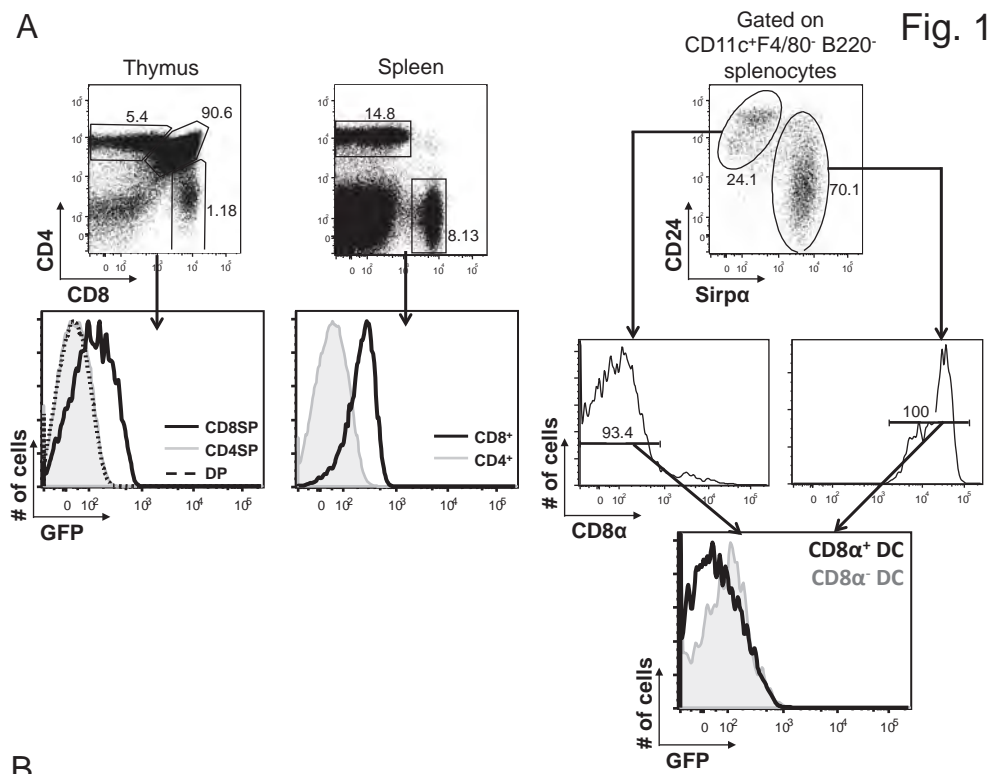


Fig. 2

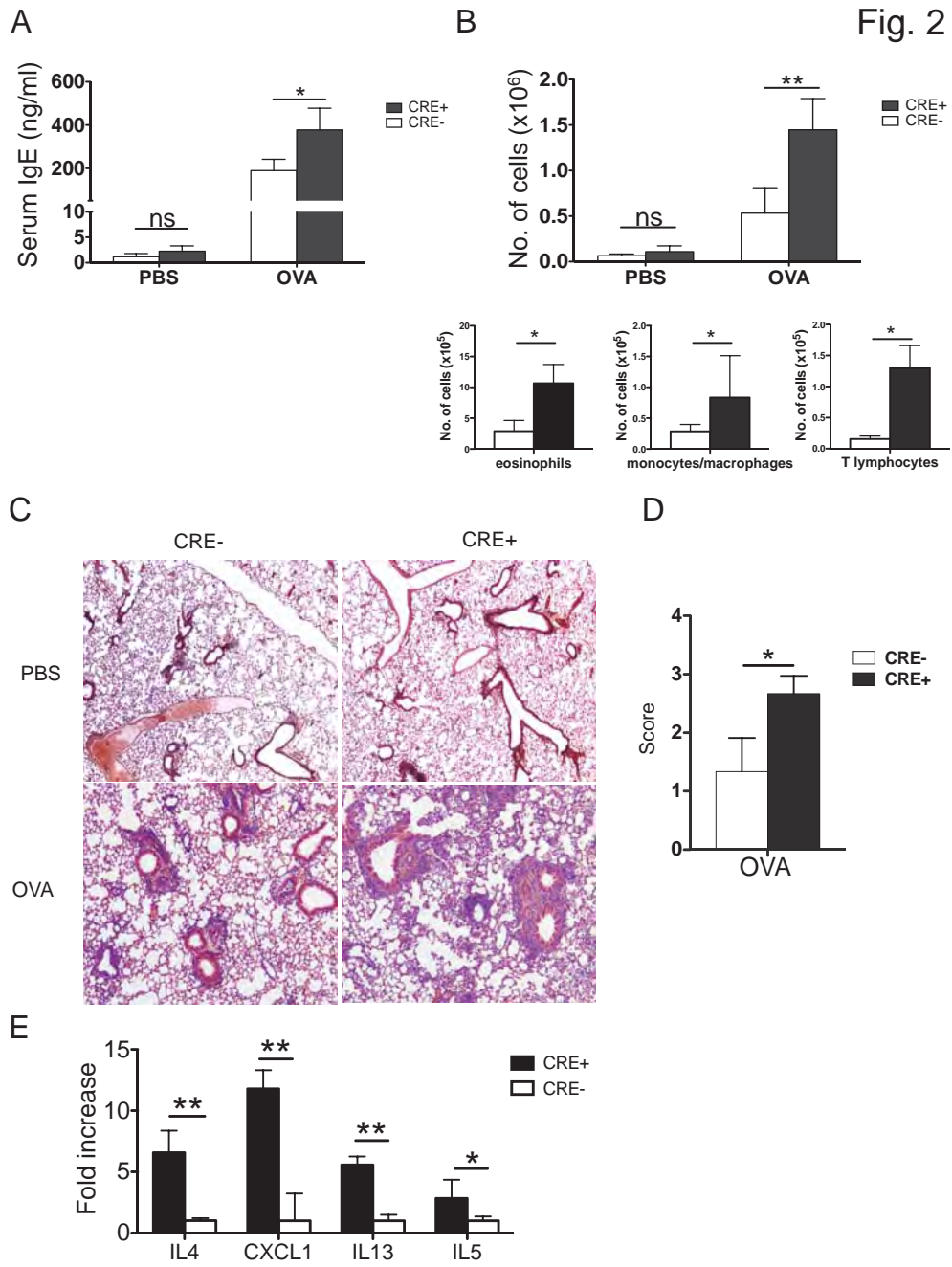




Fig. 3

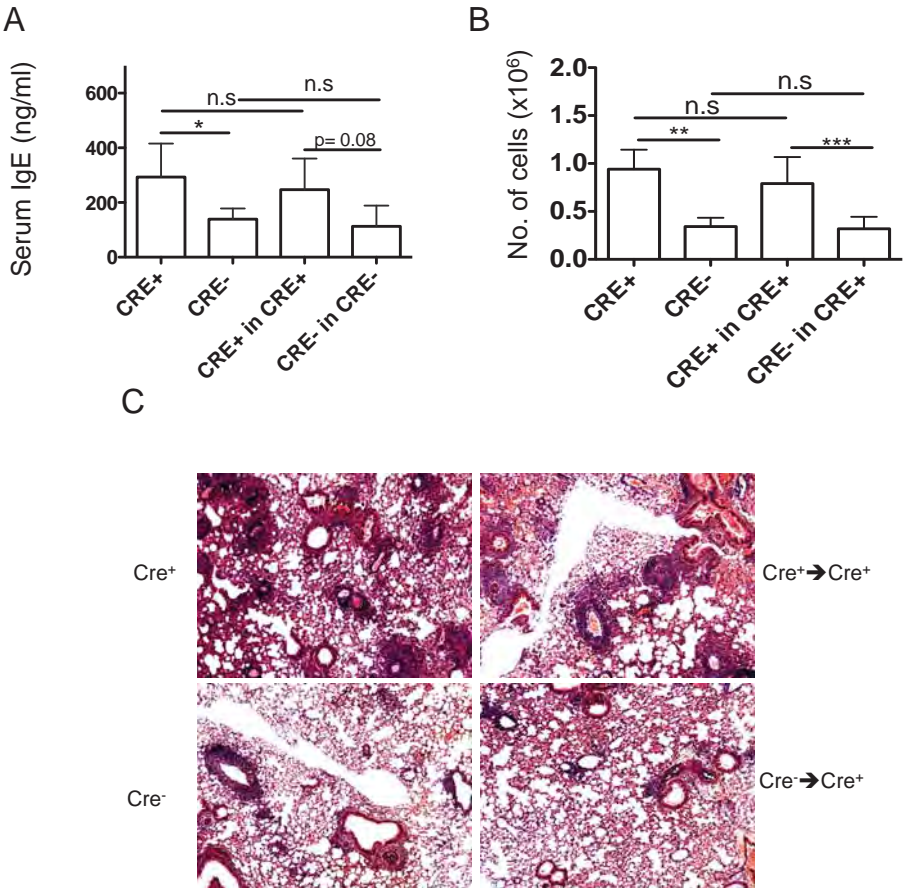
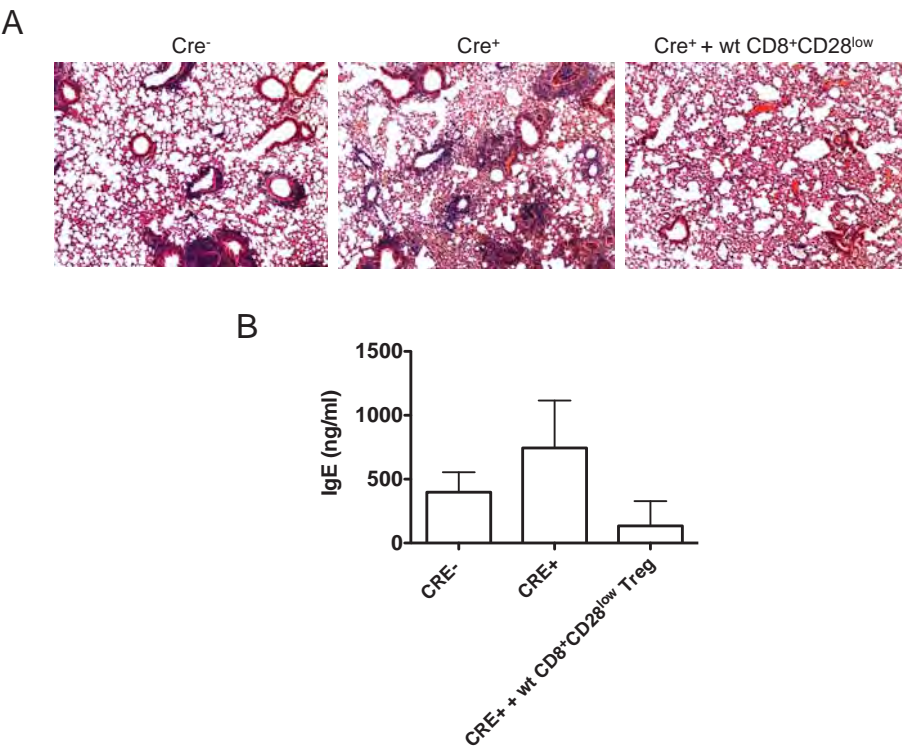




Fig. 4



## *Discussion et perspectives*

### *Rôle de Aire dans le développement des Treg CD8<sup>+</sup>CD28<sup>low</sup>*

Le rôle de AIRE dans la sélection négative de LT auto-spécifiques a été clairement démontré. Cependant aucune étude n'a pu démontrer de façon formelle l'implication de ce facteur de transcription dans la sélection thymique de populations de Treg (voir chapitre III). A notre connaissance, nos travaux ont été les premiers à démontrer qu'une déficience en Aire va conduire à un défaut fonctionnel d'une population de Treg donnée.

Depuis, une autre étude a démontré que l'expression de Aire est nécessaire pour le développement thymique de Treg CD4<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> spécifiques d'antigènes tumoraux dans un modèle murin de cancer de prostate (553). Ainsi, le rôle de Aire dans le thymus n'est pas restreint à la sélection négative de LT auto-spécifiques mais ce facteur de transcription est également impliqué dans la différenciation de populations de Treg CD8<sup>+</sup> et CD4<sup>+</sup>.

En ce qui concerne les Treg CD8<sup>+</sup>CD28<sup>low</sup>, notre hypothèse est que AIRE induit l'expression de TSA qui va permettre la sélection thymique de Treg spécifiques de ces antigènes du soi. En son absence, le répertoire des Treg CD8<sup>+</sup>CD28<sup>low</sup> est altéré comme le suggère notre analyse du répertoire TCR des Treg issus de souris AIRE<sup>-/-</sup> versus sauvages. Cependant, nous ne démontrons pas de façon formelle que c'est bien une altération de la sélection thymique des Treg CD8<sup>+</sup>CD28<sup>low</sup> qui est à l'origine du défaut fonctionnel. Pour confirmer cela, il faudra réaliser des chimères hématopoïétiques en transférant de la moelle osseuse de souris sauvages dans des souris AIRE<sup>-/-</sup> (wt → AIRE KO). Chez ces souris, les précurseurs des lymphocytes T wt vont se développer au sein d'un thymus déficient en AIRE. La capacité des Treg CD8<sup>+</sup>CD28<sup>low</sup> isolés de souris wt → AIRE KO à inhiber la colite expérimentale sera ensuite évaluée.

L'implication de Aire dans le développement de Treg CD8<sup>+</sup>CD28<sup>low</sup> murins suggère que cette population contient des cellules spécifiques pour des antigènes du soi. Une analyse sur la réponse des Treg CD8<sup>+</sup>CD28<sup>low</sup> à des antigènes du soi sera nécessaire afin de déterminer la proportion de cellules auto-spécifiques. Il sera également important de tester la capacité suppressive des Treg CD8<sup>+</sup>CD28<sup>low</sup> issus de souris AIRE<sup>-/-</sup> dans d'autres modèles de pathologies afin d'évaluer à quel point AIRE est impliqué dans le façonnement du répertoire de ces cellules.

### *Identification d'une population de Treg CD8<sup>+</sup>CD28<sup>low</sup> chez l'Homme*

L'analyse de PBMC et des échantillons de thymus humains a permis de mettre en évidence une population de LT CD8<sup>+</sup>CD28<sup>low</sup> présentant plusieurs similitudes avec les Treg CD8<sup>+</sup>CD28<sup>low</sup> murins. En effet, ces cellules qui sont retrouvées aussi bien au niveau du thymus qu'en périphérie sont capables de produire des quantités importantes des cytokines-immunomodulatrices, IL-10 et TGF-β. Afin de confirmer la capacité immunosuppressive de ces

cellules, il sera important de réaliser des tests fonctionnels avec les LT  $CD8^+CD28^{low}$  thymiques et périphériques.

Les déficiences en IL-10 et TGF- $\beta$  conduisent à des immunopathologies graves (554, 555). La mise en évidence d'une population de nTreg produisant ces cytokines immunomodulatrices chez l'Homme ouvre la voie à de nombreux axes de recherche. En effet, il sera important de caractériser (fonction, phénotype, proportion et localisation) ces cellules dans différents contextes immunologiques (maladies inflammatoires, auto-immunité, cancer, infections). Ces études constituent une étape clé dans la détermination du rôle physiologique des Treg  $CD8^+CD28^{low}$  et laisseront entrevoir une éventuelle utilité thérapeutique.

#### *Les Treg $CD8^+CD28^{low}$ humains sont distincts des Treg $CD8^+CD28^{neg}$*

Leur faible expression de CD28, leur présence au niveau du thymus, leur phénotype naïf et la production de TGF- $\beta$  et d'IL-10 par les LT  $CD8^+CD28^{low}$  humains les distinguent des Treg  $CD8^+CD28^{neg}$  décrits précédemment. En effet, les LT  $CD8^+CD28^{neg}$  possédant une capacité régulatrice ont été soit induits *in vitro* soit retrouvés chez des personnes présentant des tumeurs ou ayant subi une greffe d'organe (311). Ces cellules ont un phénotype de cellules activées/mémoires ( $CD45RO^+$ ). De plus, les LT  $CD8^+CD28^{neg}$  isolés de sujets sains ne présentent pas de capacité immunosuppressive (302). L'ensemble de ces données suggère que les Treg  $CD8^+CD28^{neg}$  sont induites en périphérie suite à des perturbations de l'homéostasie immunitaire. Ainsi, le molécule de co-stimulation CD28 peut-être considéré comme un marqueur permettant de décrire deux populations de nTreg et de iTreg  $CD8^+$  chez l'Homme.

Chez la souris, les données de la littérature ont conduit à une confusion entre les Treg  $CD8^+CD28^{low}$  et Treg  $CD8^+CD28^{neg}$ . En effet, Najafian *et al.* ont été les premiers à démontrer que les LT  $CD8^+$  totaux isolés de souris déficientes en CD28 possèdent une capacité immunosuppressive *in vitro* et peuvent diminuer la sévérité de l'EAE. Cependant dans leurs expériences de transfert adoptif de Treg  $CD8^+$ , ils utilisent des cellules provenant de souris sauvages. Or, chez la souris B6 non-manipulé, on ne retrouve pas de population de  $CD8^+CD28^{neg}$  mais uniquement des  $CD8^+CD28^{low}$  qui eux expriment clairement la molécule de co-stimulation (307). Ainsi, en partant de là, plusieurs études ont fait l'amalgame entre ces deux populations. Au vu des différences en terme de développement et fonction qui existent entre les Treg  $CD8^+CD28^{low}$  murins et les Treg  $CD8^+CD28^{neg}$  humains, il sera important de ne plus les considérer comme des populations homologues.

#### *Treg $CD4^+$ et Treg $CD8^+$ , même combat ?*

L'une des différences fondamentales entre les Treg  $CD4^+$  et les Treg  $CD8^+$  est leur ligand agoniste. Les Treg  $CD4^+$  vont reconnaître principalement des antigènes d'origine

exogène présentés par le CMH II exprimé par un nombre restreint de cellules (notamment les CPA). Les Treg CD8<sup>+</sup> vont quant à eux interagir avec le CMH I qui leur présente des antigènes endogènes et qui est exprimé par la quasi-totalité des cellules nucléées de l'organisme. Ceci permet, en théorie, des fonctions distinctes et complémentaires entre Treg CD4<sup>+</sup> et Treg CD8<sup>+</sup>.

Certes, des défauts fonctionnels dans ces deux populations sont retrouvés chez des patients souffrant de maladies auto-immunes ou inflammatoires et leur proportion augmente lors d'infections et de réponses inflammatoires. De plus les Treg CD4<sup>+</sup> tout comme les Treg CD8<sup>+</sup> sont capables de prévenir l'immuno-pathologie dans de nombreux modèles murins d'inflammation et maladies auto-immunes. Cependant il existe plusieurs évidences dans la littérature d'une certaine 'division du travail' entre Treg CD4<sup>+</sup> et Treg CD8<sup>+</sup>. En effet, chez la souris scurfy et les patients souffrant d'IPEX, l'absence de Treg CD4<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> ne peut pas être compensée par les autres populations de Treg Foxp3<sup>-</sup> restants, notamment les Treg CD8<sup>+</sup>.

Dans le modèle d'asthme allergique, une déficience en IL-10 des Treg CD4<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> conduit à une inflammation pulmonaire (537). Nous retrouvons des résultats similaires lorsque uniquement les Treg CD8<sup>+</sup> sont incapables de produire cette même cytokine. Y aurait-il une action synergique entre Treg CD4<sup>+</sup> et Treg CD8<sup>+</sup> ce qui pourrait expliquer éventuellement pourquoi des défauts fonctionnels d'une population vont impacter la capacité de l'autre population à réguler les réponses immunitaires ? Une collaboration entre Treg CD8<sup>+</sup> et Treg CD4<sup>+</sup> dans le contrôle des réponses inflammatoires au niveau intestinal a déjà été mise en évidence par Endharti *et al.* (256). Une autre explication pourrait être que les Treg CD4<sup>+</sup> et CD8<sup>+</sup> interviennent séparément à différents moments de la réponse immunitaire. Il sera donc important d'évaluer le rôle relatif de chaque population de Treg CD8<sup>+</sup> et Treg CD4<sup>+</sup> lors de l'induction de l'asthme allergique.

#### *Cibles cellulaires de l'IL-10 produite par les Treg CD8<sup>+</sup> lors de l'asthme allergique*

Afin d'étudier le mécanisme moléculaire permettant aux de Treg CD8<sup>+</sup> producteur d'IL-10 de contrôler les réponses allergiques, il sera important dans un premier temps de déterminer la ou les cibles cellulaires de l'IL-10. Cette cytokine immuno-modulatrice ayant des effets pléiotropes dans l'organisme et plusieurs cas de figures peuvent donc être envisagés.

En effet, l'IL-10 pourrait agir directement sur les cellules impliquées dans la physiopathologie de l'asthme allergique telles que l'éosinophiles, les mastocytes et les lymphocytes B (556-559). L'IL-10 pourrait également inhiber l'activation des cellules dendritiques nécessaire au déclenchement de la réponse adaptative (560-564). L'autre

hypothèse est que cette cytokine va permettre la génération d'autres populations régulatrices tels que des Tregs et des Tol-DC qui vont à leur tour moduler la réponse allergique.

Pour tester ces hypothèses, il sera nécessaire d'invalider le gène du récepteur à l'IL-10 au niveau de ces différentes populations cellulaires. Ceci peut se faire par des approches de KO-conditionnel en croisant des souris IL10Ra<sup>fl/fl</sup> (565) avec des souris exprimant la Cre-recombinase sous le contrôle de promoteur de gène spécifiquement exprimé dans les populations cellulaires d'intérêts. Ces souris seront ensuite utilisées dans notre modèle d'asthme allergique. Ceux développent des réponses allergiques plus sévères devront ensuite être croisé avec les souris E81-Cre/IL10<sup>fl/fl</sup>. Le transfert adoptif de Treg CD8<sup>+</sup> dans ces souris confirmera ou non que la cible de l'IL-10 produite par les Treg CD8<sup>+</sup>.(565)

#### *Rôle des Treg CD8<sup>+</sup> IL-10<sup>+</sup> dans le contrôle de l'homéostasie immunitaire intestinale*

L'IL-10 est une cytokine immuno-modulatrice majeure impliquée dans la régulation des réponses immunitaires à des interfaces environnementales, notamment celles dirigées contre des antigènes de la flore intestinale (566). Des défauts dans cette régulation conduisent au développement de pathologies inflammatoires intestinales. Ainsi, les souris déficientes pour IL-10 développent spontanément une entéocolite dont l'incidence et la sévérité augmente avec l'âge (567). Chez l'homme, des études récentes ont identifié l'*IL10* comme un gène de susceptibilité pour les MICI (568). L'ensemble de ces données souligne l'importance de cette cytokine dans le contrôle des réponses immunitaires au niveau de l'intestin.

Les cellules productrices d'IL-10 sont nombreuses, mais la production de l'IL-10 par les lymphocytes T à eux seuls joue un rôle majeur dans l'inhibition du développement de l'inflammation au niveau du côlon et de l'intestin grêle. En effet, chez les souris où le gène de l'IL-10 a été spécifiquement invalidé au niveau des lymphocytes T CD4<sup>+</sup> et CD8<sup>+</sup> (souris Il10<sup>fl/fl</sup>/Cd4-Cre), l'incidence et la sévérité de l'inflammation intestinale sont identiques aux souris déficientes pour l'IL-10 (569). Le rôle physiologique de l'IL-10 produite par les Tregs Foxp3<sup>+</sup> a été étudié chez des souris où le gène de cette cytokine a été invalidé spécifiquement au niveau des cellules exprimant ce facteur de transcription (souris Il10<sup>fl/fl</sup>/Foxp3-Cre). Ces souris développent spontanément une colite et une inflammation de l'intestin grêle démontrant l'importance de l'IL-10 produite par les Tregs Foxp3<sup>+</sup> (537). Toutefois, alors que la colite dont souffraient les souris Il10<sup>fl/fl</sup>/Cd4-Cre était aussi sévère que celle observée chez les souris déficientes pour l'IL-10, la pathologie était moins sévère chez les souris Il10<sup>fl/fl</sup>/Foxp3-Cre. Il semble donc que l'IL-10 produite par d'autres populations de lymphocytes T, non-identifiées à ce jour, joue également un rôle important dans la prévention de la colite.

Les LT CD8<sup>+</sup> intestinaux provenant de sujets sains ont une capacité immunosuppressive *in vitro* alors que ceux provenant de patients souffrant de MICI n'en ont pas (570). Au niveau intestinal ce sont majoritairement les LT CD8<sup>+</sup> qui produisent de l'IL-10. Ces données suggèrent donc un rôle des Treg CD8<sup>+</sup> producteurs d'IL-10 dans le contrôle de l'homéostasie immunitaire au niveau intestinal (571). Plusieurs populations de Tregs CD8<sup>+</sup>, notamment les Treg CD8<sup>+</sup>CD28<sup>low</sup>, CD8<sup>+</sup>CD122<sup>high</sup> ou CD8αα<sup>+</sup>, sont capables de prévenir le développement de l'inflammation intestinale dans un modèle de colite expérimentale chez la souris (256, 298, 310). L'inhibition de la pathologie par l'ensemble des Tregs mentionnés ci-dessus est dépendante de l'IL-10. Même si les signes cliniques et histologiques de ce modèle expérimental sont comparables à ceux retrouvés chez les patients souffrant de MICI, l'utilisation de souris lymphopéniques dans ce modèle ne permettait pas de conclure à une relevance physiologique de ces Tregs. De façon importante, les souris du fond génétique C57BL/6, sur lequel la plupart des mutations dirigées sont disponibles, sont particulièrement résistantes au développement spontané de la colite.

Afin d'évaluer l'importance des Treg CD8<sup>+</sup>IL-10<sup>+</sup> dans le contrôle des réponses immunitaires au niveau intestinal, il faudra donc utiliser nos souris Il10<sup>fl/fl</sup>/E8<sub>l</sub>-Cre dans d'autres modèles d'inflammation intestinale notamment la colite induite par *Helicobacter hepaticus* ou l'iléite induite par *Toxoplasma gondii*. Dans ces deux modèles, la prévention de l'inflammation dépend de l'IL-10 (572).

Par la suite, il sera également important d'évaluer la susceptibilité de nos souris Il10<sup>fl/fl</sup>/E8<sub>l</sub>-Cre à développer d'autres pathologies impliquant l'IL-10.

#### *Identification d'un meilleur marqueur des Treg CD8<sup>+</sup>CD28<sup>low</sup>*

A ce jour, la seule façon de caractériser notre population de Treg est en fonction d'une faible expression de la molécule de co-stimulation CD28. Notre calcul mathématique basé sur la moyenne et la médiane du signal CD28 ne donne qu'une estimation minimale de la proportion de Treg CD8<sup>+</sup>CD28<sup>low</sup> aussi bien chez la souris que chez l'Homme. De plus, une faible expression de CD28 ne nous permet pas de localiser avec précision ces cellules régulatrices au niveau des tissus et des organes lymphoïdes primaires et secondaires. Ainsi, l'identification d'un meilleur marqueur (ex. facteur de transcription, marqueur de surface) des Treg CD8<sup>+</sup>CD28<sup>low</sup> sera l'une de nos priorités pour la suite de ce projet. Une comparaison entre le transcriptome des cellules CD8<sup>+</sup>CD28<sup>low</sup> et celui des cellules CD8<sup>+</sup>CD28<sup>+</sup> permettrait éventuellement de mettre en évidence ces marqueurs.

L'identification de ce marqueur sera un atout majeur pour une meilleure caractérisation des Treg CD8<sup>+</sup>CD28<sup>low</sup>. Suivant la nature de ce marqueur nous envisageons de dépléter spécifiquement cette population, en utilisant des souris KO ou des anticorps déplétants, chez

la souris et par la suite analyser le phénotype résultant. Ceci nous permettra de déterminer le rôle physiologique des Treg  $CD8^+CD28^{low}$ . Nous pourrions également étudier plus efficacement la modulation de la proportion de ces cellules que ce soit en condition physiologique ou lors des réponses immunitaires.

*Rôle du TGF- $\beta$  produit par les Treg  $CD8^+$  dans le contrôle des réponses immunitaires.*

Notre système de KO conditionnel permet la délétion de gènes d'intérêt uniquement au niveau des lymphocytes T  $CD8^+$  laissant intacts les lymphocytes T  $CD4^+$ . Ainsi en utilisant ce système, nous pourrions évaluer le rôle des autres mécanismes suppresseurs des Treg  $CD8^+$  tels que la sécrétion du TGF- $\beta$ . En effet cette cytokine est essentielle au contrôle de nombreux type de réponses immunitaires notamment au niveau de l'intestin. De plus, dans notre modèle de colite expérimentale, la prévention de l'inflammation dépend d'une sensibilité des lymphocytes colitogènes au TGF- $\beta$  (310). Cependant, nous ignorons si ce sont les Treg  $CD8^+$  injectés qui produisent cette cytokine. Ainsi, en croisant les souris E8<sub>1</sub>-Cre avec les souris TGF- $\beta^{fl/fl}$  (573), nous génèrerons des souris présentant une ablation spécifique du TGF- $\beta$  au niveau des LT  $CD8^+$ . La susceptibilité de ces souris à développer différents immunopathologies seront ensuite évaluer.

En conclusion, nos travaux ont permis de mettre en évidence l'origine thymique des Treg  $CD8^+CD28^{low}$  chez la souris et chez l'Homme. Cette population de Treg naturel est impliquée dans la modulation des réponses immunitaires au niveau des muqueuses telles que l'intestine et les poumons via un mécanisme dépendent de l'IL-10.



## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. Lai AY, Kondo M. 2006. Asymmetrical lymphoid and myeloid lineage commitment in multipotent hematopoietic progenitors. *J Exp Med* 203: 1867-73
2. Mansson R, Hultquist A, Luc S, Yang L, Anderson K, Kharazi S, Al-Hashmi S, Liuba K, Thoren L, Adolfsson J, Buza-Vidas N, Qian H, Soneji S, Enver T, Sigvardsson M, Jacobsen SE. 2007. Molecular evidence for hierarchical transcriptional lineage priming in fetal and adult stem cells and multipotent progenitors. *Immunity* 26: 407-19
3. Kondo M, Weissman IL, Akashi K. 1997. Identification of clonogenic common lymphoid progenitors in mouse bone marrow. *Cell* 91: 661-72
4. Allman D, Sambandam A, Kim S, Miller JP, Pagan A, Well D, Meraz A, Bhandoola A. 2003. Thymopoiesis independent of common lymphoid progenitors. *Nat Immunol* 4: 168-74
5. Ramond C, Berthault C, Burlen-Defranoux O, de Sousa AP, Guy-Grand D, Vieira P, Pereira P, Cumano A. 2014. Two waves of distinct hematopoietic progenitor cells colonize the fetal thymus. *Nat Immunol* 15: 27-35
6. Zlotoff DA, Sambandam A, Logan TD, Bell JJ, Schwarz BA, Bhandoola A. 2010. CCR7 and CCR9 together recruit hematopoietic progenitors to the adult thymus. *Blood* 115: 1897-905
7. Liu C, Ueno T, Kuse S, Saito F, Nitta T, Piali L, Nakano H, Kakiuchi T, Lipp M, Hollander GA, Takahama Y. 2005. The role of CCL21 in recruitment of T-precursor cells to fetal thymi. *Blood* 105: 31-9
8. Rossi FM, Corbel SY, Merzaban JS, Carlow DA, Gossens K, Duenas J, So L, Yi L, Ziltener HJ. 2005. Recruitment of adult thymic progenitors is regulated by P-selectin and its ligand PSGL-1. *Nat Immunol* 6: 626-34
9. Calderon L, Boehm T. 2011. Three chemokine receptors cooperatively regulate homing of hematopoietic progenitors to the embryonic mouse thymus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108: 7517-22
10. Robertson P, Means TK, Luster AD, Scadden DT. 2006. CXCR4 and CCR5 mediate homing of primitive bone marrow-derived hematopoietic cells to the postnatal thymus. *Exp Hematol* 34: 308-19
11. Stimamiglio MA, Jimenez E, Silva-Barbosa SD, Alfaro D, Garcia-Ceca JJ, Munoz JJ, Cejalvo T, Savino W, Zapata A. 2010. EphB2-mediated interactions are essential for proper migration of T cell progenitors during fetal thymus colonization. *J Leukoc Biol* 88: 483-94
12. Ceredig R, Bosco N, Rolink AG. 2007. The B lineage potential of thymus settling progenitors is critically dependent on mouse age. *Eur J Immunol* 37: 830-7
13. Lind EF, Prockop SE, Porritt HE, Petrie HT. 2001. Mapping precursor movement through the postnatal thymus reveals specific microenvironments supporting defined stages of early lymphoid development. *J Exp Med* 194: 127-34
14. Radtke F, Wilson A, Stark G, Bauer M, van Meerwijk J, MacDonald HR, Aguet M. 1999. Deficient T cell fate specification in mice with an induced inactivation of Notch1. *Immunity* 10: 547-58
15. Hozumi K, Mailhos C, Negishi N, Hirano K, Yahata T, Ando K, Zuklys S, Hollander GA, Shima DT, Habu S. 2008. Delta-like 4 is indispensable in thymic environment specific for T cell development. *J Exp Med* 205: 2507-13
16. Bell JJ, Bhandoola A. 2008. The earliest thymic progenitors for T cells possess myeloid lineage potential. *Nature* 452: 764-7
17. Feyerabend TB, Terszowski G, Tietz A, Blum C, Luche H, Gossler A, Gale NW, Radtke F, Fehling HJ, Rodewald HR. 2009. Deletion of Notch1 converts pro-T cells

- to dendritic cells and promotes thymic B cells by cell-extrinsic and cell-intrinsic mechanisms. *Immunity* 30: 67-79
18. Wada H, Masuda K, Satoh R, Kakugawa K, Ikawa T, Katsura Y, Kawamoto H. 2008. Adult T-cell progenitors retain myeloid potential. *Nature* 452: 768-72
  19. Hosoya T, Kuroha T, Moriguchi T, Cummings D, Maillard I, Lim KC, Engel JD. 2009. GATA-3 is required for early T lineage progenitor development. *J Exp Med* 206: 2987-3000
  20. Banerjee A, Northrup D, Boukarabila H, Jacobsen SE, Allman D. 2013. Transcriptional repression of Gata3 is essential for early B cell commitment. *Immunity* 38: 930-42
  21. Godfrey DI, Zlotnik A, Suda T. 1992. Phenotypic and functional characterization of c-kit expression during intrathymic T cell development. *J Immunol* 149: 2281-5
  22. Taghon TN, David ES, Zuniga-Pflucker JC, Rothenberg EV. 2005. Delayed, asynchronous, and reversible T-lineage specification induced by Notch/Delta signaling. *Genes Dev* 19: 965-78
  23. Capone M, Hockett RD, Jr., Zlotnik A. 1998. Kinetics of T cell receptor beta, gamma, and delta rearrangements during adult thymic development: T cell receptor rearrangements are present in CD44(+)CD25(+) Pro-T thymocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95: 12522-7
  24. Livak F, Tourigny M, Schatz DG, Petrie HT. 1999. Characterization of TCR gene rearrangements during adult murine T cell development. *J Immunol* 162: 2575-80
  25. Huang J, Durum SK, Muegge K. 2001. Cutting edge: histone acetylation and recombination at the TCR gamma locus follows IL-7 induction. *J Immunol* 167: 6073-7
  26. Kang J, Volkmann A, Raulet DH. 2001. Evidence that gammadelta versus alphabeta T cell fate determination is initiated independently of T cell receptor signaling. *J Exp Med* 193: 689-98
  27. Taghon T, Yui MA, Pant R, Diamond RA, Rothenberg EV. 2006. Developmental and molecular characterization of emerging beta- and gammadelta-selected pre-T cells in the adult mouse thymus. *Immunity* 24: 53-64
  28. Burtrum DB, Kim S, Dudley EC, Hayday AC, Petrie HT. 1996. TCR gene recombination and alpha beta-gamma delta lineage divergence: productive TCR-beta rearrangement is neither exclusive nor preclusive of gamma delta cell development. *J Immunol* 157: 4293-6
  29. von Boehmer H. 2005. Unique features of the pre-T-cell receptor alpha-chain: not just a surrogate. *Nat Rev Immunol* 5: 571-7
  30. Porritt HE, Gordon K, Petrie HT. 2003. Kinetics of steady-state differentiation and mapping of intrathymic-signaling environments by stem cell transplantation in nonirradiated mice. *J Exp Med* 198: 957-62
  31. Oettinger MA, Schatz DG, Gorka C, Baltimore D. 1990. RAG-1 and RAG-2, adjacent genes that synergistically activate V(D)J recombination. *Science* 248: 1517-23
  32. von Boehmer H. 2004. Selection of the T-cell repertoire: receptor-controlled checkpoints in T-cell development. *Adv Immunol* 84: 201-38
  33. Ciofani M, Zuniga-Pflucker JC. 2005. Notch promotes survival of pre-T cells at the beta-selection checkpoint by regulating cellular metabolism. *Nat Immunol* 6: 881-8
  34. Trampont PC, Tosello-Trampont AC, Shen Y, Duley AK, Sutherland AE, Bender TP, Littman DR, Ravichandran KS. 2010. CXCR4 acts as a costimulator during thymic beta-selection. *Nat Immunol* 11: 162-70
  35. Gounari F, Aifantis I, Martin C, Fehling HJ, Hoeflinger S, Leder P, von Boehmer H, Reizis B. 2002. Tracing lymphopoiesis with the aid of a pTalpha-controlled reporter gene. *Nat Immunol* 3: 489-96

36. Takeuchi A, Yamasaki S, Takase K, Nakatsu F, Arase H, Onodera M, Saito T. 2001. E2A and HEB activate the pre-TCR alpha promoter during immature T cell development. *J Immunol* 167: 2157-63
37. Trop S, Rhodes M, Wiest DL, Hugo P, Zuniga-Pflucker JC. 2000. Competitive displacement of pT alpha by TCR-alpha during TCR assembly prevents surface coexpression of pre-TCR and alpha beta TCR. *J Immunol* 165: 5566-72
38. Kyewski B, Klein L. 2006. A central role for central tolerance. *Annu Rev Immunol* 24: 571-606
39. Chong MM, Cornish AL, Darwiche R, Stanley EG, Purton JF, Godfrey DI, Hilton DJ, Starr R, Alexander WS, Kay TW. 2003. Suppressor of cytokine signaling-1 is a critical regulator of interleukin-7-dependent CD8+ T cell differentiation. *Immunity* 18: 475-87
40. Yu Q, Park JH, Doan LL, Erman B, Feigenbaum L, Singer A. 2006. Cytokine signal transduction is suppressed in preselection double-positive thymocytes and restored by positive selection. *J Exp Med* 203: 165-75
41. Petrie HT, Livak F, Schatz DG, Strasser A, Crispe IN, Shortman K. 1993. Multiple rearrangements in T cell receptor alpha chain genes maximize the production of useful thymocytes. *J Exp Med* 178: 615-22
42. Huesmann M, Scott B, Kisielow P, von Boehmer H. 1991. Kinetics and efficacy of positive selection in the thymus of normal and T cell receptor transgenic mice. *Cell* 66: 533-40
43. Merckenschlager M, Graf D, Lovatt M, Bommhardt U, Zamoyska R, Fisher AG. 1997. How many thymocytes audition for selection? *J Exp Med* 186: 1149-58
44. Cosgrove D, Chan SH, Waltzinger C, Benoist C, Mathis D. 1992. The thymic compartment responsible for positive selection of CD4+ T cells. *Int Immunol* 4: 707-10
45. Laufer TM, DeKoning J, Markowitz JS, Lo D, Glimcher LH. 1996. Unopposed positive selection and autoreactivity in mice expressing class II MHC only on thymic cortex. *Nature* 383: 81-5
46. Capone M, Romagnoli P, Beermann F, MacDonald HR, van Meerwijk JP. 2001. Dissociation of thymic positive and negative selection in transgenic mice expressing major histocompatibility complex class I molecules exclusively on thymic cortical epithelial cells. *Blood* 97: 1336-42
47. Florea BI, Verdoes M, Li N, van der Linden WA, Geurink PP, van den Elst H, Hofmann T, de Ru A, van Veelen PA, Tanaka K, Sasaki K, Murata S, den Dulk H, Brouwer J, Ossendorp FA, Kisselev AF, Overkleeft HS. 2010. Activity-based profiling reveals reactivity of the murine thymoproteasome-specific subunit beta5t. *Chem Biol* 17: 795-801
48. Murata S, Sasaki K, Kishimoto T, Niwa S, Hayashi H, Takahama Y, Tanaka K. 2007. Regulation of CD8+ T cell development by thymus-specific proteasomes. *Science* 316: 1349-53
49. Nitta T, Murata S, Sasaki K, Fujii H, Ripen AM, Ishimaru N, Koyasu S, Tanaka K, Takahama Y. 2010. Thymoproteasome shapes immunocompetent repertoire of CD8+ T cells. *Immunity* 32: 29-40
50. Nakagawa T, Roth W, Wong P, Nelson A, Farr A, Deussing J, Villadangos JA, Ploegh H, Peters C, Rudensky AY. 1998. Cathepsin L: critical role in Ii degradation and CD4 T cell selection in the thymus. *Science* 280: 450-3
51. Gommeaux J, Gregoire C, Nguessan P, Richelme M, Malissen M, Guerder S, Malissen B, Carrier A. 2009. Thymus-specific serine protease regulates positive selection of a subset of CD4+ thymocytes. *Eur J Immunol* 39: 956-64
52. Nedjic J, Aichinger M, Mizushima N, Klein L. 2009. Macroautophagy, endogenous MHC II loading and T cell selection: the benefits of breaking the rules. *Curr Opin Immunol* 21: 92-7

53. Nedjic J, Aichinger M, Emmerich J, Mizushima N, Klein L. 2008. Autophagy in thymic epithelium shapes the T-cell repertoire and is essential for tolerance. *Nature* 455: 396-400
54. Teh HS, Kisielow P, Scott B, Kishi H, Uematsu Y, Bluthmann H, von Boehmer H. 1988. Thymic major histocompatibility complex antigens and the alpha beta T-cell receptor determine the CD4/CD8 phenotype of T cells. *Nature* 335: 229-33
55. Leung RK, Thomson K, Gallimore A, Jones E, Van den Broek M, Sierro S, Alsheikhly AR, McMichael A, Rahemtulla A. 2001. Deletion of the CD4 silencer element supports a stochastic mechanism of thymocyte lineage commitment. *Nat Immunol* 2: 1167-73
56. Robey EA, Fowlkes BJ, Gordon JW, Kioussis D, von Boehmer H, Ramsdell F, Axel R. 1991. Thymic selection in CD8 transgenic mice supports an instructive model for commitment to a CD4 or CD8 lineage. *Cell* 64: 99-107
57. Sarafova SD, Erman B, Yu Q, Van Laethem F, Guinter T, Sharrow SO, Feigenbaum L, Wildt KF, Ellmeier W, Singer A. 2005. Modulation of coreceptor transcription during positive selection dictates lineage fate independently of TCR/coreceptor specificity. *Immunity* 23: 75-87
58. Singer A, Adoro S, Park JH. 2008. Lineage fate and intense debate: myths, models and mechanisms of CD4- versus CD8-lineage choice. *Nat Rev Immunol* 8: 788-801
59. Seong RH, Chamberlain JW, Parnes JR. 1992. Signal for T-cell differentiation to a CD4 cell lineage is delivered by CD4 transmembrane region and/or cytoplasmic tail. *Nature* 356: 718-20
60. Itano A, Salmon P, Kioussis D, Tolaini M, Corbella P, Robey E. 1996. The cytoplasmic domain of CD4 promotes the development of CD4 lineage T cells. *J Exp Med* 183: 731-41
61. Shaw AS, Amrein KE, Hammond C, Stern DF, Sefton BM, Rose JK. 1989. The lck tyrosine protein kinase interacts with the cytoplasmic tail of the CD4 glycoprotein through its unique amino-terminal domain. *Cell* 59: 627-36
62. Wiest DL, Yuan L, Jefferson J, Benveniste P, Tsokos M, Klausner RD, Glimcher LH, Samelson LE, Singer A. 1993. Regulation of T cell receptor expression in immature CD4+CD8+ thymocytes by p56lck tyrosine kinase: basis for differential signaling by CD4 and CD8 in immature thymocytes expressing both coreceptor molecules. *J Exp Med* 178: 1701-12
63. Love PE, Lee J, Shores EW. 2000. Critical relationship between TCR signaling potential and TCR affinity during thymocyte selection. *J Immunol* 165: 3080-7
64. Erman B, Alag AS, Dahle O, van Laethem F, Sarafova SD, Guinter TI, Sharrow SO, Grinberg A, Love PE, Singer A. 2006. Coreceptor signal strength regulates positive selection but does not determine CD4/CD8 lineage choice in a physiologic in vivo model. *J Immunol* 177: 6613-25
65. Singer A. 2002. New perspectives on a developmental dilemma: the kinetic signaling model and the importance of signal duration for the CD4/CD8 lineage decision. *Curr Opin Immunol* 14: 207-15
66. Bosselut R, Guinter TI, Sharrow SO, Singer A. 2003. Unraveling a revealing paradox: Why major histocompatibility complex I-signaled thymocytes "paradoxically" appear as CD4+8lo transitional cells during positive selection of CD8+ T cells. *J Exp Med* 197: 1709-19
67. Brugnera E, Bhandoola A, Cibotti R, Yu Q, Guinter TI, Yamashita Y, Sharrow SO, Singer A. 2000. Coreceptor reversal in the thymus: signaled CD4+8+ thymocytes initially terminate CD8 transcription even when differentiating into CD8+ T cells. *Immunity* 13: 59-71
68. Yu Q, Erman B, Bhandoola A, Sharrow SO, Singer A. 2003. In vitro evidence that cytokine receptor signals are required for differentiation of double positive thymocytes into functionally mature CD8+ T cells. *J Exp Med* 197: 475-87



69. Catlett IM, Hedrick SM. 2005. Suppressor of cytokine signaling 1 is required for the differentiation of CD4+ T cells. *Nat Immunol* 6: 715-21
70. Sawada S, Scarborough JD, Killeen N, Littman DR. 1994. A lineage-specific transcriptional silencer regulates CD4 gene expression during T lymphocyte development. *Cell* 77: 917-29
71. Siu G, Wurster AL, Duncan DD, Soliman TM, Hedrick SM. 1994. A transcriptional silencer controls the developmental expression of the CD4 gene. *EMBO J* 13: 3570-9
72. Ellmeier W, Sunshine MJ, Losos K, Littman DR. 1998. Multiple developmental stage-specific enhancers regulate CD8 expression in developing thymocytes and in thymus-independent T cells. *Immunity* 9: 485-96
73. Hostert A, Garefalaki A, Mavria G, Tolaini M, Roderick K, Norton T, Mee PJ, Tybulewicz VL, Coles M, Kioussis D. 1998. Hierarchical interactions of control elements determine CD8alpha gene expression in subsets of thymocytes and peripheral T cells. *Immunity* 9: 497-508
74. Ellmeier W, Sunshine MJ, Losos K, Hatam F, Littman DR. 1997. An enhancer that directs lineage-specific expression of CD8 in positively selected thymocytes and mature T cells. *Immunity* 7: 537-47
75. Hostert A, Tolaini M, Festenstein R, McNeill L, Malissen B, Williams O, Zamoyska R, Kioussis D. 1997. A CD8 genomic fragment that directs subset-specific expression of CD8 in transgenic mice. *J Immunol* 158: 4270-81
76. Feik N, Bilic I, Tinhofer J, Unger B, Littman DR, Ellmeier W. 2005. Functional and molecular analysis of the double-positive stage-specific CD8 enhancer E8III during thymocyte development. *J Immunol* 174: 1513-24
77. Hostert A, Tolaini M, Roderick K, Harker N, Norton T, Kioussis D. 1997. A region in the CD8 gene locus that directs expression to the mature CD8 T cell subset in transgenic mice. *Immunity* 7: 525-36
78. Park JH, Adoro S, Lucas PJ, Sarafova SD, Alag AS, Doan LL, Erman B, Liu X, Ellmeier W, Bosselut R, Feigenbaum L, Singer A. 2007. 'Coreceptor tuning': cytokine signals transcriptionally tailor CD8 coreceptor expression to the self-specificity of the TCR. *Nat Immunol* 8: 1049-59
79. He X, He X, Dave VP, Zhang Y, Hua X, Nicolas E, Xu W, Roe BA, Kappes DJ. 2005. The zinc finger transcription factor Th-POK regulates CD4 versus CD8 T-cell lineage commitment. *Nature* 433: 826-33
80. Sun G, Liu X, Mercado P, Jenkinson SR, Kypriotou M, Feigenbaum L, Galera P, Bosselut R. 2005. The zinc finger protein cKrox directs CD4 lineage differentiation during intrathymic T cell positive selection. *Nat Immunol* 6: 373-81
81. Jenkinson SR, Intlekofer AM, Sun G, Feigenbaum L, Reiner SL, Bosselut R. 2007. Expression of the transcription factor cKrox in peripheral CD8 T cells reveals substantial postthymic plasticity in CD4-CD8 lineage differentiation. *J Exp Med* 204: 267-72
82. Taniuchi I, Osato M, Egawa T, Sunshine MJ, Bae SC, Komori T, Ito Y, Littman DR. 2002. Differential requirements for Runx proteins in CD4 repression and epigenetic silencing during T lymphocyte development. *Cell* 111: 621-33
83. Levanon D, Groner Y. 2004. Structure and regulated expression of mammalian RUNX genes. *Oncogene* 23: 4211-9
84. Sato T, Ohno S, Hayashi T, Sato C, Kohu K, Satake M, Habu S. 2005. Dual functions of Runx proteins for reactivating CD8 and silencing CD4 at the commitment process into CD8 thymocytes. *Immunity* 22: 317-28
85. Setoguchi R, Tachibana M, Naoe Y, Muroi S, Akiyama K, Tezuka C, Okuda T, Taniuchi I. 2008. Repression of the transcription factor Th-POK by Runx complexes in cytotoxic T cell development. *Science* 319: 822-5

86. Schilham MW, Clevers H. 1998. HMG box containing transcription factors in lymphocyte differentiation. *Semin Immunol* 10: 127-32
87. Stros M, Launholt D, Grasser KD. 2007. The HMG-box: a versatile protein domain occurring in a wide variety of DNA-binding proteins. *Cell Mol Life Sci* 64: 2590-606
88. Aliahmad P, Kaye J. 2008. Development of all CD4 T lineages requires nuclear factor TOX. *J Exp Med* 205: 245-56
89. Hendriks RW, Nawijn MC, Engel JD, van Doorninck H, Grosveld F, Karis A. 1999. Expression of the transcription factor GATA-3 is required for the development of the earliest T cell progenitors and correlates with stages of cellular proliferation in the thymus. *Eur J Immunol* 29: 1912-8
90. Hernandez-Hoyos G, Anderson MK, Wang C, Rothenberg EV, Alberola-Ila J. 2003. GATA-3 expression is controlled by TCR signals and regulates CD4/CD8 differentiation. *Immunity* 19: 83-94
91. Nawijn MC, Ferreira R, Dingjan GM, Kahre O, Drabek D, Karis A, Grosveld F, Hendriks RW. 2001. Enforced expression of GATA-3 during T cell development inhibits maturation of CD8 single-positive cells and induces thymic lymphoma in transgenic mice. *J Immunol* 167: 715-23
92. Pai SY, Truitt ML, Ting CN, Leiden JM, Glimcher LH, Ho IC. 2003. Critical roles for transcription factor GATA-3 in thymocyte development. *Immunity* 19: 863-75
93. Grant LR, Yao ZJ, Hedrich CM, Wang F, Moorthy A, Wilson K, Ranatunga D, Bream JH. 2008. Stat4-dependent, T-bet-independent regulation of IL-10 in NK cells. *Genes Immun* 9: 316-27
94. Campbell JJ, Pan J, Butcher EC. 1999. Cutting edge: developmental switches in chemokine responses during T cell maturation. *J Immunol* 163: 2353-7
95. Davalos-Misslitz AC, Worbs T, Willenzon S, Bernhardt G, Forster R. 2007. Impaired responsiveness to T-cell receptor stimulation and defective negative selection of thymocytes in CCR7-deficient mice. *Blood* 110: 4351-9
96. Suzuki G, Nakata Y, Dan Y, Uzawa A, Nakagawa K, Saito T, Mita K, Shirasawa T. 1998. Loss of SDF-1 receptor expression during positive selection in the thymus. *Int Immunol* 10: 1049-56
97. Kurobe H, Liu C, Ueno T, Saito F, Ohigashi I, Seach N, Arakaki R, Hayashi Y, Kitagawa T, Lipp M, Boyd RL, Takahama Y. 2006. CCR7-dependent cortex-to-medulla migration of positively selected thymocytes is essential for establishing central tolerance. *Immunity* 24: 165-77
98. Boehm T, Scheu S, Pfeffer K, Bleul CC. 2003. Thymic medullary epithelial cell differentiation, thymocyte emigration, and the control of autoimmunity require lympho-epithelial cross talk via LTbetaR. *J Exp Med* 198: 757-69
99. Akiyama T, Maeda S, Yamane S, Ogino K, Kasai M, Kajiura F, Matsumoto M, Inoue J. 2005. Dependence of self-tolerance on TRAF6-directed development of thymic stroma. *Science* 308: 248-51
100. Kisielow P, Bluthmann H, Staerz UD, Steinmetz M, von Boehmer H. 1988. Tolerance in T-cell-receptor transgenic mice involves deletion of nonmature CD4+8+ thymocytes. *Nature* 333: 742-6
101. Hogquist KA, Baldwin TA, Jameson SC. 2005. Central tolerance: learning self-control in the thymus. *Nat Rev Immunol* 5: 772-82
102. Baldwin TA, Sandau MM, Jameson SC, Hogquist KA. 2005. The timing of TCR alpha expression critically influences T cell development and selection. *J Exp Med* 202: 111-21
103. Kappler JW, Roehm N, Marrack P. 1987. T cell tolerance by clonal elimination in the thymus. *Cell* 49: 273-80

104. McCarty N, Paust S, Ikizawa K, Dan I, Li X, Cantor H. 2005. Signaling by the kinase MINK is essential in the negative selection of autoreactive thymocytes. *Nat Immunol* 6: 65-72
105. Ramsdell F, Lantz T, Fowlkes BJ. 1989. A nondeletional mechanism of thymic self tolerance. *Science* 246: 1038-41
106. Ramsdell F, Fowlkes BJ. 1992. Maintenance of in vivo tolerance by persistence of antigen. *Science* 257: 1130-4
107. Anderson MS, Venanzi ES, Klein L, Chen Z, Berzins SP, Turley SJ, von Boehmer H, Bronson R, Dierich A, Benoist C, Mathis D. 2002. Projection of an immunological self shadow within the thymus by the aire protein. *Science* 298: 1395-401
108. Gallegos AM, Bevan MJ. 2004. Central tolerance to tissue-specific antigens mediated by direct and indirect antigen presentation. *J Exp Med* 200: 1039-49
109. Hinterberger M, Aichinger M, Prazeres da Costa O, Voehringer D, Hoffmann R, Klein L. 2010. Autonomous role of medullary thymic epithelial cells in central CD4(+) T cell tolerance. *Nat Immunol* 11: 512-9
110. Wu L, Shortman K. 2005. Heterogeneity of thymic dendritic cells. *Semin Immunol* 17: 304-12
111. Koble C, Kyewski B. 2009. The thymic medulla: a unique microenvironment for intercellular self-antigen transfer. *J Exp Med* 206: 1505-13
112. Taniguchi RT, DeVoss JJ, Moon JJ, Sidney J, Sette A, Jenkins MK, Anderson MS. 2012. Detection of an autoreactive T-cell population within the polyclonal repertoire that undergoes distinct autoimmune regulator (Aire)-mediated selection. *Proc Natl Acad Sci U S A* 109: 7847-52
113. van Meerwijk JP, MacDonald HR. 1999. In vivo T-lymphocyte tolerance in the absence of thymic clonal deletion mediated by hematopoietic cells. *Blood* 93: 3856-62
114. Hoffmann MW, Allison J, Miller JF. 1992. Tolerance induction by thymic medullary epithelium. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89: 2526-30
115. Schonrich G, Momburg F, Hammerling GJ, Arnold B. 1992. Anergy induced by thymic medullary epithelium. *Eur J Immunol* 22: 1687-91
116. Hudrisier D, Feau S, Bonnet V, Romagnoli P, Van Meerwijk JP. 2003. In vivo maintenance of T-lymphocyte unresponsiveness induced by thymic medullary epithelium requires antigen presentation by radioresistant cells. *Immunology* 108: 24-31
117. Roberts JL, Sharrow SO, Singer A. 1990. Clonal deletion and clonal anergy in the thymus induced by cellular elements with different radiation sensitivities. *J Exp Med* 171: 935-40
118. van Meerwijk JP, Marguerat S, Lees RK, Germain RN, Fowlkes BJ, MacDonald HR. 1997. Quantitative impact of thymic clonal deletion on the T cell repertoire. *J Exp Med* 185: 377-83
119. McCaughy TM, Wilken MS, Hogquist KA. 2007. Thymic emigration revisited. *J Exp Med* 204: 2513-20
120. Kishimoto H, Sprent J. 1997. Negative selection in the thymus includes semimature T cells. *J Exp Med* 185: 263-71
121. Wurbel MA, Malissen M, Guy-Grand D, Meffre E, Nussenzweig MC, Richelme M, Carrier A, Malissen B. 2001. Mice lacking the CCR9 CC-chemokine receptor show a mild impairment of early T- and B-cell development and a reduction in T-cell receptor gamma delta(+) gut intraepithelial lymphocytes. *Blood* 98: 2626-32
122. Uehara S, Grinberg A, Farber JM, Love PE. 2002. A role for CCR9 in T lymphocyte development and migration. *J Immunol* 168: 2811-9
123. Ueno T, Saito F, Gray DH, Kuse S, Hieshima K, Nakano H, Kakiuchi T, Lipp M, Boyd RL, Takahama Y. 2004. CCR7 signals are essential for cortex-medulla migration of developing thymocytes. *J Exp Med* 200: 493-505

124. Matloubian M, Lo CG, Cinamon G, Lesneski MJ, Xu Y, Brinkmann V, Allende ML, Proia RL, Cyster JG. 2004. Lymphocyte egress from thymus and peripheral lymphoid organs is dependent on S1P receptor 1. *Nature* 427: 355-60
125. Zachariah MA, Cyster JG. 2010. Neural crest-derived pericytes promote egress of mature thymocytes at the corticomedullary junction. *Science* 328: 1129-35
126. Pappu R, Schwab SR, Cornelissen I, Pereira JP, Regard JB, Xu Y, Camerer E, Zheng YW, Huang Y, Cyster JG, Coughlin SR. 2007. Promotion of lymphocyte egress into blood and lymph by distinct sources of sphingosine-1-phosphate. *Science* 316: 295-8
127. Love PE, Bhandoola A. 2011. Signal integration and crosstalk during thymocyte migration and emigration. *Nat Rev Immunol* 11: 469-77
128. Liu GY, Fairchild PJ, Smith RM, Prowle JR, Kioussis D, Wraith DC. 1995. Low avidity recognition of self-antigen by T cells permits escape from central tolerance. *Immunity* 3: 407-15
129. Ohashi PS, Oehen S, Buerki K, Pircher H, Ohashi CT, Odermatt B, Malissen B, Zinkernagel RM, Hengartner H. 1991. Ablation of "tolerance" and induction of diabetes by virus infection in viral antigen transgenic mice. *Cell* 65: 305-17
130. Mrass P, Weninger W. 2006. Immune cell migration as a means to control immune privilege: lessons from the CNS and tumors. *Immunol Rev* 213: 195-212
131. Perez VL, Van Parijs L, Biuckians A, Zheng XX, Strom TB, Abbas AK. 1997. Induction of peripheral T cell tolerance in vivo requires CTLA-4 engagement. *Immunity* 6: 411-7
132. Probst HC, McCoy K, Okazaki T, Honjo T, van den Broek M. 2005. Resting dendritic cells induce peripheral CD8+ T cell tolerance through PD-1 and CTLA-4. *Nat Immunol* 6: 280-6
133. Fife BT, Pauken KE. 2011. The role of the PD-1 pathway in autoimmunity and peripheral tolerance. *Ann N Y Acad Sci* 1217: 45-59
134. Macian F, Garcia-Cozar F, Im SH, Horton HF, Byrne MC, Rao A. 2002. Transcriptional mechanisms underlying lymphocyte tolerance. *Cell* 109: 719-31
135. Powell JD, Delgoffe GM. 2010. The mammalian target of rapamycin: linking T cell differentiation, function, and metabolism. *Immunity* 33: 301-11
136. Cohen PL, Eisenberg RA. 1991. Lpr and gld: single gene models of systemic autoimmunity and lymphoproliferative disease. *Annu Rev Immunol* 9: 243-69
137. Lenardo MJ. 1991. Interleukin-2 programs mouse alpha beta T lymphocytes for apoptosis. *Nature* 353: 858-61
138. Hildeman DA, Zhu Y, Mitchell TC, Bouillet P, Strasser A, Kappler J, Marrack P. 2002. Activated T cell death in vivo mediated by proapoptotic bcl-2 family member bim. *Immunity* 16: 759-67
139. Bouillet P, Metcalf D, Huang DC, Tarlinton DM, Kay TW, Kontgen F, Adams JM, Strasser A. 1999. Proapoptotic Bcl-2 relative Bim required for certain apoptotic responses, leukocyte homeostasis, and to preclude autoimmunity. *Science* 286: 1735-8
140. Davey GM, Kurts C, Miller JF, Bouillet P, Strasser A, Brooks AG, Carbone FR, Heath WR. 2002. Peripheral deletion of autoreactive CD8 T cells by cross presentation of self-antigen occurs by a Bcl-2-inhibitable pathway mediated by Bim. *J Exp Med* 196: 947-55
141. Carballido JM, Faith A, Carballido-Perrig N, Blaser K. 1997. The intensity of T cell receptor engagement determines the cytokine pattern of human allergen-specific T helper cells. *Eur J Immunol* 27: 515-21
142. Liblau RS, Singer SM, McDevitt HO. 1995. Th1 and Th2 CD4+ T cells in the pathogenesis of organ-specific autoimmune diseases. *Immunol Today* 16: 34-8
143. Morelli AE, Thomson AW. 2007. Tolerogenic dendritic cells and the quest for transplant tolerance. *Nat Rev Immunol* 7: 610-21



144. Fletcher AL, Malhotra D, Turley SJ. 2011. Lymph node stroma broaden the peripheral tolerance paradigm. *Trends Immunol* 32: 12-8
145. Walker LS, Abbas AK. 2002. The enemy within: keeping self-reactive T cells at bay in the periphery. *Nat Rev Immunol* 2: 11-9
146. von Boehmer H. 2003. Dynamics of suppressor T cells: in vivo veritas. *J Exp Med* 198: 845-9
147. Nishizuka Y, Sakakura T. 1969. Thymus and reproduction: sex-linked dysgenesis of the gonad after neonatal thymectomy in mice. *Science* 166: 753-5
148. Gershon RK, Kondo K. 1970. Cell interactions in the induction of tolerance: the role of thymic lymphocytes. *Immunology* 18: 723-37
149. Gershon RK, Kondo K. 1971. Infectious immunological tolerance. *Immunology* 21: 903-14
150. Penhale WJ, Farmer A, McKenna RP, Irvine WJ. 1973. Spontaneous thyroiditis in thymectomized and irradiated Wistar rats. *Clin Exp Immunol* 15: 225-36
151. Penhale WJ, Stumbles PA, Huxtable CR, Sutherland RJ, Pethick DW. 1990. Induction of diabetes in PVG/c strain rats by manipulation of the immune system. *Autoimmunity* 7: 169-79
152. Sakaguchi S, Fukuma K, Kuribayashi K, Masuda T. 1985. Organ-specific autoimmune diseases induced in mice by elimination of T cell subset. I. Evidence for the active participation of T cells in natural self-tolerance; deficit of a T cell subset as a possible cause of autoimmune disease. *J Exp Med* 161: 72-87
153. Bacchetta R, Bigler M, Touraine JL, Parkman R, Tovo PA, Abrams J, de Waal Malefyt R, de Vries JE, Roncarolo MG. 1994. High levels of interleukin 10 production in vivo are associated with tolerance in SCID patients transplanted with HLA mismatched hematopoietic stem cells. *J Exp Med* 179: 493-502
154. Cantor H, Shen FW, Boyse EA. 1976. Separation of helper T cells from suppressor T cells expressing different Ly components. II. Activation by antigen: after immunization, antigen-specific suppressor and helper activities are mediated by distinct T-cell subclasses. *J Exp Med* 143: 1391-40
155. Jandinski J, Cantor H, Tadakuma T, Peavy DL, Pierce CW. 1976. Separation of helper T cells from suppressor T cells expressing different Ly components. I. Polyclonal activation: suppressor and helper activities are inherent properties of distinct T-cell subclasses. *J Exp Med* 143: 1382-90
156. Powrie F, Mason D. 1990. OX-22high CD4+ T cells induce wasting disease with multiple organ pathology: prevention by the OX-22low subset. *J Exp Med* 172: 1701-8
157. Asherson GL, Zembala M. 1982. The role of the T acceptor cell in suppressor systems. Antigen-specific T suppressor factor acts via a T acceptor cell; this releases a nonspecific inhibitor of the transfer of contact sensitivity when exposed to antigen in the context of I-J. *Ann N Y Acad Sci* 392: 71-89
158. Tada T, Taniguchi M, David CS. 1976. Properties of the antigen-specific suppressive T-cell factor in the regulation of antibody response of the mouse. IV. Special subregion assignment of the gene(s) that codes for the suppressive T-cell factor in the H-2 histocompatibility complex. *J Exp Med* 144: 713-25
159. Kronenberg M, Steinmetz M, Kober J, Kraig E, Kapp JA, Pierce CW, Sorensen CM, Suzuki G, Tada T, Hood L. 1983. RNA transcripts for I-J polypeptides are apparently not encoded between the I-A and I-E subregions of the murine major histocompatibility complex. *Proc Natl Acad Sci U S A* 80: 5704-8
160. Steinmetz M, Minard K, Horvath S, McNicholas J, Srelinger J, Wake C, Long E, Mach B, Hood L. 1982. A molecular map of the immune response region from the major histocompatibility complex of the mouse. *Nature* 300: 35-42
161. Qin S, Cobbold SP, Pope H, Elliott J, Kioussis D, Davies J, Waldmann H. 1993. "Infectious" transplantation tolerance. *Science* 259: 974-7

162. Sakaguchi S, Sakaguchi N, Asano M, Itoh M, Toda M. 1995. Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor alpha-chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases. *J Immunol* 155: 1151-64
163. Asano M, Toda M, Sakaguchi N, Sakaguchi S. 1996. Autoimmune disease as a consequence of developmental abnormality of a T cell subpopulation. *J Exp Med* 184: 387-96
164. Fontenot JD, Gavin MA, Rudensky AY. 2003. Foxp3 programs the development and function of CD4+CD25+ regulatory T cells. *Nat Immunol* 4: 330-6
165. Hori S, Nomura T, Sakaguchi S. 2003. Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3. *Science* 299: 1057-61
166. Khattri R, Cox T, Yasayko SA, Ramsdell F. 2003. An essential role for Scurfin in CD4+CD25+ T regulatory cells. *Nat Immunol* 4: 337-42
167. Russell WL, Russell LB, Gower JS. 1959. Exceptional Inheritance of a Sex-Linked Gene in the Mouse Explained on the Basis That the X/O Sex-Chromosome Constitution Is Female. *Proc Natl Acad Sci U S A* 45: 554-60
168. Blair PJ, Bultman SJ, Haas JC, Rouse BT, Wilkinson JE, Godfrey VL. 1994. CD4+CD8- T cells are the effector cells in disease pathogenesis in the scurfy (sf) mouse. *J Immunol* 153: 3764-74
169. Brunkow ME, Jeffery EW, Hjerrild KA, Paeper B, Clark LB, Yasayko SA, Wilkinson JE, Galas D, Ziegler SF, Ramsdell F. 2001. Disruption of a new forkhead/winged-helix protein, scurf, results in the fatal lymphoproliferative disorder of the scurfy mouse. *Nat Genet* 27: 68-73.
170. Powell BR, Buist NR, Stenzel P. 1982. An X-linked syndrome of diarrhea, polyendocrinopathy, and fatal infection in infancy. *J Pediatr* 100: 731-7
171. Bennett CL, Christie J, Ramsdell F, Brunkow ME, Ferguson PJ, Whitesell L, Kelly TE, Saulsbury FT, Chance PF, Ochs HD. 2001. The immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X-linked syndrome (IPEX) is caused by mutations of FOXP3. *Nature genetics* 27: 20-1
172. Khattri R, Kasprowicz D, Cox T, Mortrud M, Appleby MW, Brunkow ME, Ziegler SF, Ramsdell F. 2001. The amount of scurf protein determines peripheral T cell number and responsiveness. *J Immunol* 167: 6312-20
173. Fontenot JD, Dooley JL, Farr AG, Rudensky AY. 2005. Developmental regulation of Foxp3 expression during ontogeny. *The Journal of experimental medicine* 202: 901-6
174. Kim JM, Rasmussen JP, Rudensky AY. 2007. Regulatory T cells prevent catastrophic autoimmunity throughout the lifespan of mice. *Nat Immunol* 8: 191-7
175. Romagnoli P, Hudrisier D, van Meerwijk JP. 2002. Preferential recognition of self antigens despite normal thymic deletion of CD4(+)CD25(+) regulatory T cells. *J Immunol* 168: 1644-8
176. Hsieh CS, Liang Y, Tyznik AJ, Self SG, Liggitt D, Rudensky AY. 2004. Recognition of the peripheral self by naturally arising CD25+ CD4+ T cell receptors. *Immunity* 21: 267-77
177. Ribot J, Enault G, Pilipenko S, Huchenq A, Calise M, Hudrisier D, Romagnoli P, van Meerwijk JP. 2007. Shaping of the autoreactive regulatory T cell repertoire by thymic cortical positive selection. *J Immunol* 179: 6741-8
178. Jordan MS, Boesteanu A, Reed AJ, Petrone AL, Hohenbeck AE, Lerman MA, Naji A, Caton AJ. 2001. Thymic selection of CD4+CD25+ regulatory T cells induced by an agonist self-peptide. *Nat Immunol* 2: 301-6
179. Salomon B, Lenschow DJ, Rhee L, Ashourian N, Singh B, Sharpe A, Bluestone JA. 2000. B7/CD28 costimulation is essential for the homeostasis of the CD4+CD25+

- immunoregulatory T cells that control autoimmune diabetes. *Immunity* 12: 431-40
180. Tai X, Cowan M, Feigenbaum L, Singer A. 2005. CD28 costimulation of developing thymocytes induces Foxp3 expression and regulatory T cell differentiation independently of interleukin 2. *Nat Immunol* 6: 152-62
  181. Shih FF, Mandik-Nayak L, Wipke BT, Allen PM. 2004. Massive thymic deletion results in systemic autoimmunity through elimination of CD4+ CD25+ T regulatory cells. *J Exp Med* 199: 323-35
  182. Pennington DJ, Silva-Santos B, Silberzahn T, Escorcio-Correia M, Woodward MJ, Roberts SJ, Smith AL, Dyson PJ, Hayday AC. 2006. Early events in the thymus affect the balance of effector and regulatory T cells. *Nature* 444: 1073-7
  183. Fontenot JD, Rasmussen JP, Gavin MA, Rudensky AY. 2005. A function for interleukin 2 in Foxp3-expressing regulatory T cells. *Nat Immunol* 6: 1142-51
  184. Vang KB, Yang J, Mahmud SA, Burchill MA, Vegoe AL, Farrar MA. 2008. IL-2, -7, and -15, but not thymic stromal lymphopoietin, redundantly govern CD4+Foxp3+ regulatory T cell development. *J Immunol* 181: 3285-90
  185. Konkel JE, Jin W, Abbatiello B, Grainger JR, Chen W. 2014. Thymocyte apoptosis drives the intrathymic generation of regulatory T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 111: E465-73
  186. Curotto de Lafaille MA, Lafaille JJ. 2009. Natural and adaptive foxp3+ regulatory T cells: more of the same or a division of labor? *Immunity* 30: 626-35
  187. Davidson TS, DiPaolo RJ, Andersson J, Shevach EM. 2007. Cutting Edge: IL-2 is essential for TGF-beta-mediated induction of Foxp3+ T regulatory cells. *J Immunol* 178: 4022-6
  188. Selvaraj RK, Geiger TL. 2007. A kinetic and dynamic analysis of Foxp3 induced in T cells by TGF-beta. *J Immunol* 179: 11 p following 1390
  189. Zheng SG, Gray JD, Ohtsuka K, Yamagiwa S, Horwitz DA. 2002. Generation ex vivo of TGF-beta-producing regulatory T cells from CD4+CD25- precursors. *J Immunol* 169: 4183-9
  190. Gottschalk RA, Corse E, Allison JP. 2010. TCR ligand density and affinity determine peripheral induction of Foxp3 in vivo. *J Exp Med* 207: 1701-11
  191. Oliveira VG, Caridade M, Paiva RS, Demengeot J, Graca L. 2011. Sub-optimal CD4+ T-cell activation triggers autonomous TGF-beta-dependent conversion to Foxp3+ regulatory T cells. *Eur J Immunol* 41: 1249-55
  192. Josefowicz SZ, Niec RE, Kim HY, Treuting P, Chinen T, Zheng Y, Umetsu DT, Rudensky AY. 2012. Extrathymically generated regulatory T cells control mucosal TH2 inflammation. *Nature* 482: 395-9
  193. Wu Y, Borde M, Heissmeyer V, Feuerer M, Lapan AD, Stroud JC, Bates DL, Guo L, Han A, Ziegler SF, Mathis D, Benoist C, Chen L, Rao A. 2006. FOXP3 controls regulatory T cell function through cooperation with NFAT. *Cell* 126: 375-87
  194. Li B, Samanta A, Song X, Iacono KT, Bembas K, Tao R, Basu S, Riley JL, Hancock WW, Shen Y, Saouaf SJ, Greene MI. 2007. FOXP3 interactions with histone acetyltransferase and class II histone deacetylases are required for repression. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104: 4571-6
  195. Li B, Samanta A, Song X, Iacono KT, Brennan P, Chatila TA, Roncador G, Banham AH, Riley JL, Wang Q, Shen Y, Saouaf SJ, Greene MI. 2007. FOXP3 is a homooligomer and a component of a supramolecular regulatory complex disabled in the human XLAAD/IPEX autoimmune disease. *Int Immunol* 19: 825-35
  196. Pan F, Yu H, Dang EV, Barbi J, Pan X, Grosso JF, Jinasena D, Sharma SM, McCadden EM, Getnet D, Drake CG, Liu JO, Ostrowski MC, Pardoll DM. 2009. Eos mediates Foxp3-dependent gene silencing in CD4+ regulatory T cells. *Science* 325: 1142-6

197. Ono M, Yaguchi H, Ohkura N, Kitabayashi I, Nagamura Y, Nomura T, Miyachi Y, Tsukada T, Sakaguchi S. 2007. Foxp3 controls regulatory T-cell function by interacting with AML1/Runx1. *Nature* 446: 685-9
198. Rudra D, deRoos P, Chaudhry A, Niec RE, Arvey A, Samstein RM, Leslie C, Shaffer SA, Goodlett DR, Rudensky AY. 2012. Transcription factor Foxp3 and its protein partners form a complex regulatory network. *Nat Immunol* 13: 1010-9
199. Marson A, Kretschmer K, Frampton GM, Jacobsen ES, Polansky JK, MacIsaac KD, Levine SS, Fraenkel E, von Boehmer H, Young RA. 2007. Foxp3 occupancy and regulation of key target genes during T-cell stimulation. *Nature* 445: 931-5
200. Zheng Y, Josefowicz SZ, Kas A, Chu TT, Gavin MA, Rudensky AY. 2007. Genome-wide analysis of Foxp3 target genes in developing and mature regulatory T cells. *Nature* 445: 936-40
201. Long M, Park SG, Strickland I, Hayden MS, Ghosh S. 2009. Nuclear factor-kappaB modulates regulatory T cell development by directly regulating expression of Foxp3 transcription factor. *Immunity* 31: 921-31
202. Ruan Q, Kameswaran V, Tone Y, Li L, Liou HC, Greene MI, Tone M, Chen YH. 2009. Development of Foxp3(+) regulatory t cells is driven by the c-Rel enhanceosome. *Immunity* 31: 932-40
203. Zheng Y, Josefowicz S, Chaudhry A, Peng XP, Forbush K, Rudensky AY. 2010. Role of conserved non-coding DNA elements in the Foxp3 gene in regulatory T-cell fate. *Nature* 463: 808-12
204. Deenick EK, Elford AR, Pellegrini M, Hall H, Mak TW, Ohashi PS. 2010. c-Rel but not NF-kappaB1 is important for T regulatory cell development. *Eur J Immunol* 40: 677-81
205. Tone Y, Furuuchi K, Kojima Y, Tykocinski ML, Greene MI, Tone M. 2008. Smad3 and NFAT cooperate to induce Foxp3 expression through its enhancer. *Nat Immunol* 9: 194-202
206. Kitoh A, Ono M, Naoe Y, Ohkura N, Yamaguchi T, Yaguchi H, Kitabayashi I, Tsukada T, Nomura T, Miyachi Y, Taniuchi I, Sakaguchi S. 2009. Indispensable role of the Runx1-Cbfbeta transcription complex for in vivo-suppressive function of FoxP3+ regulatory T cells. *Immunity* 31: 609-20
207. Huehn J, Polansky JK, Hamann A. 2009. Epigenetic control of FOXP3 expression: the key to a stable regulatory T-cell lineage? *Nat Rev Immunol* 9: 83-9
208. Huan J, Culbertson N, Spencer L, Bartholomew R, Burrows GG, Chou YK, Bourdette D, Ziegler SF, Offner H, Vandenbark AA. 2005. Decreased FOXP3 levels in multiple sclerosis patients. *J Neurosci Res* 81: 45-52
209. Valencia X, Stephens G, Goldbach-Mansky R, Wilson M, Shevach EM, Lipsky PE. 2006. TNF downmodulates the function of human CD4+CD25hi T-regulatory cells. *Blood* 108: 253-61
210. Viglietta V, Baecher-Allan C, Weiner HL, Hafler DA. 2004. Loss of functional suppression by CD4+CD25+ regulatory T cells in patients with multiple sclerosis. *J Exp Med* 199: 971-9
211. Sugiyama H, Gyulai R, Toichi E, Garaczi E, Shimada S, Stevens SR, McCormick TS, Cooper KD. 2005. Dysfunctional blood and target tissue CD4+CD25high regulatory T cells in psoriasis: mechanism underlying unrestrained pathogenic effector T cell proliferation. *J Immunol* 174: 164-73
212. Lindley S, Dayan CM, Bishop A, Roep BO, Peakman M, Tree TI. 2005. Defective suppressor function in CD4(+)CD25(+) T-cells from patients with type 1 diabetes. *Diabetes* 54: 92-9
213. Balandina A, Lecart S, Darteville P, Saoudi A, Berrih-Aknin S. 2005. Functional defect of regulatory CD4(+)CD25+ T cells in the thymus of patients with autoimmune myasthenia gravis. *Blood* 105: 735-41



214. Roncador G, Brown PJ, Maestre L, Hue S, Martinez-Torrecuadrada JL, Ling KL, Pratap S, Toms C, Fox BC, Cerundolo V, Powrie F, Banham AH. 2005. Analysis of FOXP3 protein expression in human CD4+CD25+ regulatory T cells at the single-cell level. *Eur J Immunol* 35: 1681-91
215. Allan SE, Passerini L, Bacchetta R, Crellin N, Dai M, Orban PC, Ziegler SF, Roncarolo MG, Levings MK. 2005. The role of 2 FOXP3 isoforms in the generation of human CD4+ Tregs. *J Clin Invest* 115: 3276-84
216. Gavin MA, Torgerson TR, Houston E, DeRoos P, Ho WY, Stray-Pedersen A, Ocheltree EL, Greenberg PD, Ochs HD, Rudensky AY. 2006. Single-cell analysis of normal and FOXP3-mutant human T cells: FOXP3 expression without regulatory T cell development. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103: 6659-64
217. Tafuri A, Alferink J, Moller P, Hammerling GJ, Arnold B. 1995. T cell awareness of paternal alloantigens during pregnancy. *Science* 270: 630-3
218. Shima T, Sasaki Y, Itoh M, Nakashima A, Ishii N, Sugamura K, Saito S. 2010. Regulatory T cells are necessary for implantation and maintenance of early pregnancy but not late pregnancy in allogeneic mice. *J Reprod Immunol* 85: 121-9
219. Teles A, Schumacher A, Kuhnle MC, Linzke N, Thuere C, Reichardt P, Tadokoro CE, Hammerling GJ, Zenclussen AC. 2013. Control of uterine microenvironment by foxp3(+) cells facilitates embryo implantation. *Front Immunol* 4: 158
220. Lanteri MC, O'Brien KM, Purtha WE, Cameron MJ, Lund JM, Owen RE, Heitman JW, Custer B, Hirschhorn DF, Tobler LH, Kiely N, Prince HE, Ndhlovu LC, Nixon DF, Kamel HT, Kelvin DJ, Busch MP, Rudensky AY, Diamond MS, Norris PJ. 2009. Tregs control the development of symptomatic West Nile virus infection in humans and mice. *J Clin Invest* 119: 3266-77
221. Lund JM, Hsing L, Pham TT, Rudensky AY. 2008. Coordination of early protective immunity to viral infection by regulatory T cells. *Science* 320: 1220-4
222. Haque A, Best SE, Amante FH, Mustafah S, Desbarrieres L, de Labastida F, Sparwasser T, Hill GR, Engwerda CR. 2010. CD4+ natural regulatory T cells prevent experimental cerebral malaria via CTLA-4 when expanded in vivo. *PLoS Pathog* 6: e1001221
223. Oldenhove G, Bouladoux N, Wohlfert EA, Hall JA, Chou D, Dos Santos L, O'Brien S, Blank R, Lamb E, Natarajan S, Kastenmayer R, Hunter C, Grigg ME, Belkaid Y. 2009. Decrease of Foxp3+ Treg cell number and acquisition of effector cell phenotype during lethal infection. *Immunity* 31: 772-86
224. Shafiani S, Tucker-Heard G, Kariyone A, Takatsu K, Urdahl KB. 2010. Pathogen-specific regulatory T cells delay the arrival of effector T cells in the lung during early tuberculosis. *J Exp Med* 207: 1409-20
225. Johanns TM, Ertelt JM, Rowe JH, Way SS. 2010. Regulatory T cell suppressive potency dictates the balance between bacterial proliferation and clearance during persistent Salmonella infection. *PLoS Pathog* 6: e1001043
226. Scott-Browne JP, Shafiani S, Tucker-Heard G, Ishida-Tsubota K, Fontenot JD, Rudensky AY, Bevan MJ, Urdahl KB. 2007. Expansion and function of Foxp3-expressing T regulatory cells during tuberculosis. *J Exp Med* 204: 2159-69
227. Curiel TJ, Coukos G, Zou L, Alvarez X, Cheng P, Mottram P, Evdemon-Hogan M, Conejo-Garcia JR, Zhang L, Burow M, Zhu Y, Wei S, Kryczek I, Daniel B, Gordon A, Myers L, Lackner A, Disis ML, Knutson KL, Chen L, Zou W. 2004. Specific recruitment of regulatory T cells in ovarian carcinoma fosters immune privilege and predicts reduced survival. *Nat Med* 10: 942-9
228. Hiraoka N, Onozato K, Kosuge T, Hirohashi S. 2006. Prevalence of FOXP3+ regulatory T cells increases during the progression of pancreatic ductal adenocarcinoma and its premalignant lesions. *Clin Cancer Res* 12: 5423-34
229. Boissonnas A, Scholer-Dahirel A, Simon-Blancal V, Pace L, Valet F, Kissenpfennig A, Sparwasser T, Malissen B, Fetler L, Amigorena S. 2010. Foxp3+ T cells induce

- perforin-dependent dendritic cell death in tumor-draining lymph nodes. *Immunity* 32: 266-78
230. Tan W, Zhang W, Strasner A, Grivennikov S, Cheng JQ, Hoffman RM, Karin M. 2011. Tumour-infiltrating regulatory T cells stimulate mammary cancer metastasis through RANKL-RANK signalling. *Nature* 470: 548-53
  231. Wildin RS, Smyk-Pearson S, Filipovich AH. 2002. Clinical and molecular features of the immunodysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X linked (IPEX) syndrome. *J Med Genet* 39: 537-45
  232. Asseman C, Mauze S, Leach MW, Coffman RL, Powrie F. 1999. An essential role for interleukin 10 in the function of regulatory T cells that inhibit intestinal inflammation. *J Exp Med* 190: 995-1004
  233. Akl A, Jones ND, Rogers N, Bakr MA, Mostafa A, El Shehawy el M, Ghoneim MA, Wood KJ. 2008. An investigation to assess the potential of CD25highCD4+ T cells to regulate responses to donor alloantigens in clinically stable renal transplant recipients. *Transpl Int* 21: 65-73
  234. Martinez-Llordella M, Puig-Pey I, Orlando G, Ramoni M, Tisone G, Rimola A, Lerut J, Latinne D, Margarit C, Bilbao I, Brouard S, Hernandez-Fuentes M, Souillou JP, Sanchez-Fueyo A. 2007. Multiparameter immune profiling of operational tolerance in liver transplantation. *Am J Transplant* 7: 309-19
  235. Meloni F, Vitulo P, Bianco AM, Paschetto E, Morosini M, Cascina A, Mazzucchelli I, Ciardelli L, Oggionni T, Fietta AM, Pozzi E, Vigano M. 2004. Regulatory CD4+CD25+ T cells in the peripheral blood of lung transplant recipients: correlation with transplant outcome. *Transplantation* 77: 762-6
  236. Tao R, de Zoeten EF, Ozkaynak E, Wang L, Li B, Greene MI, Wells AD, Hancock WW. 2007. Histone deacetylase inhibitors and transplantation. *Curr Opin Immunol* 19: 589-95
  237. Joffre O, Santolaria T, Calise D, Al Saati T, Hudrisier D, Romagnoli P, van Meerwijk JP. 2008. Prevention of acute and chronic allograft rejection with CD4+CD25+Foxp3+ regulatory T lymphocytes. *Nat Med* 14: 88-92
  238. Cobbold SP, Castejon R, Adams E, Zelenika D, Graca L, Humm S, Waldmann H. 2004. Induction of foxP3+ regulatory T cells in the periphery of T cell receptor transgenic mice tolerized to transplants. *J Immunol* 172: 6003-10
  239. Lin CY, Graca L, Cobbold SP, Waldmann H. 2002. Dominant transplantation tolerance impairs CD8+ T cell function but not expansion. *Nat Immunol* 3: 1208-13
  240. Ochando JC, Yopp AC, Yang Y, Garin A, Li Y, Boros P, Llodra J, Ding Y, Lira SA, Krieger NR, Bromberg JS. 2005. Lymph node occupancy is required for the peripheral development of alloantigen-specific Foxp3+ regulatory T cells. *J Immunol* 174: 6993-7005
  241. Hawrylowicz CM, O'Garra A. 2005. Potential role of interleukin-10-secreting regulatory T cells in allergy and asthma. *Nat Rev Immunol* 5: 271-83
  242. Mann MK, Maresz K, Shriver LP, Tan Y, Dittel BN. 2007. B cell regulation of CD4+CD25+ T regulatory cells and IL-10 via B7 is essential for recovery from experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Immunol* 178: 3447-56
  243. Gondek DC, Lu LF, Quezada SA, Sakaguchi S, Noelle RJ. 2005. Cutting edge: contact-mediated suppression by CD4+CD25+ regulatory cells involves a granzyme B-dependent, perforin-independent mechanism. *J Immunol* 174: 1783-6
  244. Ren X, Ye F, Jiang Z, Chu Y, Xiong S, Wang Y. 2007. Involvement of cellular death in TRAIL/DR5-dependent suppression induced by CD4(+)CD25(+) regulatory T cells. *Cell Death Differ* 14: 2076-84

245. Garin MI, Chu CC, Golshayan D, Cernuda-Morollon E, Wait R, Lechler RI. 2007. Galectin-1: a key effector of regulation mediated by CD4+CD25+ T cells. *Blood* 109: 2058-65
246. Cao X, Cai SF, Fehniger TA, Song J, Collins LI, Piwnica-Worms DR, Ley TJ. 2007. Granzyme B and perforin are important for regulatory T cell-mediated suppression of tumor clearance. *Immunity* 27: 635-46
247. Huang CT, Workman CJ, Flies D, Pan X, Marson AL, Zhou G, Hipkiss EL, Ravi S, Kowalski J, Levitsky HI, Powell JD, Pardoll DM, Drake CG, Vignali DA. 2004. Role of LAG-3 in regulatory T cells. *Immunity* 21: 503-13
248. Serra P, Amrani A, Yamanouchi J, Han B, Thiessen S, Utsugi T, Verdaguer J, Santamaria P. 2003. CD40 ligation releases immature dendritic cells from the control of regulatory CD4+CD25+ T cells. *Immunity* 19: 877-89
249. Sarris M, Andersen KG, Randow F, Mayr L, Betz AG. 2008. Neuropilin-1 expression on regulatory T cells enhances their interactions with dendritic cells during antigen recognition. *Immunity* 28: 402-13
250. de la Rosa M, Rutz S, Dorninger H, Scheffold A. 2004. Interleukin-2 is essential for CD4+CD25+ regulatory T cell function. *Eur J Immunol* 34: 2480-8
251. Bopp T, Becker C, Klein M, Klein-Hessling S, Palmetshofer A, Serfling E, Heib V, Becker M, Kubach J, Schmitt S, Stoll S, Schild H, Staeger MS, Stassen M, Jonuleit H, Schmitt E. 2007. Cyclic adenosine monophosphate is a key component of regulatory T cell-mediated suppression. *J Exp Med* 204: 1303-10
252. Deaglio S, Dwyer KM, Gao W, Friedman D, Usheva A, Erat A, Chen JF, Enjoji K, Linden J, Oukka M, Kuchroo VK, Strom TB, Robson SC. 2007. Adenosine generation catalyzed by CD39 and CD73 expressed on regulatory T cells mediates immune suppression. *J Exp Med* 204: 1257-65
253. Fallarino F, Grohmann U, Hwang KW, Orabona C, Vacca C, Bianchi R, Belladonna ML, Fioretti MC, Alegre ML, Puccetti P. 2003. Modulation of tryptophan catabolism by regulatory T cells. *Nat Immunol* 4: 1206-12
254. Suzuki H, Kundig TM, Furlonger C, Wakeham A, Timms E, Matsuyama T, Schmits R, Simard JJ, Ohashi PS, Griesser H, et al. 1995. Deregulated T cell activation and autoimmunity in mice lacking interleukin-2 receptor beta. *Science* 268: 1472-6
255. Rifa'i M, Kawamoto Y, Nakashima I, Suzuki H. 2004. Essential roles of CD8+CD122+ regulatory T cells in the maintenance of T cell homeostasis. *J Exp Med* 200: 1123-34
256. Endharti AT, Okuno Y, Shi Z, Misawa N, Toyokuni S, Ito M, Isobe K, Suzuki H. 2011. CD8+CD122+ regulatory T cells (Tregs) and CD4+ Tregs cooperatively prevent and cure CD4+ cell-induced colitis. *J Immunol* 186: 41-52
257. Lee YH, Ishida Y, Rifa'i M, Shi Z, Isobe K, Suzuki H. 2008. Essential role of CD8+CD122+ regulatory T cells in the recovery from experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Immunol* 180: 825-32
258. Saitoh O, Abiru N, Nakahara M, Nagayama Y. 2007. CD8+CD122+ T cells, a newly identified regulatory T subset, negatively regulate Graves' hyperthyroidism in a murine model. *Endocrinology* 148: 6040-6
259. Dai H, Wan N, Zhang S, Moore Y, Wan F, Dai Z. 2010. Cutting edge: programmed death-1 defines CD8+CD122+ T cells as regulatory versus memory T cells. *J Immunol* 185: 803-7
260. Shi Z, Okuno Y, Rifa'i M, Endharti AT, Akane K, Isobe K, Suzuki H. 2009. Human CD8+CXCR3+ T cells have the same function as murine CD8+CD122+ Treg. *Eur J Immunol* 39: 2106-19
261. Cantor H, Boyse EA. 1975. Functional subclasses of T lymphocytes bearing different Ly antigens. II. Cooperation between subclasses of Ly+ cells in the generation of killer activity. *J Exp Med* 141: 1390-9

262. Noble A, Pestano GA, Cantor H. 1998. Suppression of immune responses by CD8 cells. I. Superantigen-activated CD8 cells induce unidirectional Fas-mediated apoptosis of antigen-activated CD4 cells. *J Immunol* 160: 559-65
263. Hu D, Ikizawa K, Lu L, Sanchirico ME, Shinohara ML, Cantor H. 2004. Analysis of regulatory CD8 T cells in Qa-1-deficient mice. *Nat Immunol* 5: 516-23
264. Jiang H, Curran S, Ruiz-Vazquez E, Liang B, Winchester R, Chess L. 2003. Regulatory CD8+ T cells fine-tune the myelin basic protein-reactive T cell receptor V beta repertoire during experimental autoimmune encephalomyelitis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100: 8378-83
265. Jiang H, Kashleva H, Xu LX, Forman J, Flaherty L, Pernis B, Braunstein NS, Chess L. 1998. T cell vaccination induces T cell receptor Vbeta-specific Qa-1-restricted regulatory CD8(+) T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95: 4533-7
266. Jiang H, Zhang SI, Pernis B. 1992. Role of CD8+ T cells in murine experimental allergic encephalomyelitis. *Science* 256: 1213-5
267. Beeston T, Smith TR, Maricic I, Tang X, Kumar V. 2010. Involvement of IFN-gamma and perforin, but not Fas/FasL interactions in regulatory T cell-mediated suppression of experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Neuroimmunol* 229: 91-7
268. Tang X, Maricic I, Purohit N, Bakamjian B, Reed-Loisel LM, Beeston T, Jensen P, Kumar V. 2006. Regulation of immunity by a novel population of Qa-1-restricted CD8alphaalpha+TCRalphabeta+ T cells. *J Immunol* 177: 7645-55
269. Kim HJ, Verbinen B, Tang X, Lu L, Cantor H. 2010. Inhibition of follicular T-helper cells by CD8(+) regulatory T cells is essential for self tolerance. *Nature* 467: 328-32
270. Jiang H, Canfield SM, Gallagher MP, Jiang HH, Jiang Y, Zheng Z, Chess L. 2010. HLA-E-restricted regulatory CD8(+) T cells are involved in development and control of human autoimmune type 1 diabetes. *J Clin Invest* 120: 3641-50
271. Shmidt TE, Zhuchenko TD, Iakhno NN. 2003. [Glatiramer acetate (Copaxone) influence on different stages of multiple sclerosis pathogenesis]. *Zh Nevrol Psikhiatr Im S S Korsakova*: 79-82
272. Uss E, Rowshani AT, Hooibrink B, Lardy NM, van Lier RA, ten Berge IJ. 2006. CD103 is a marker for alloantigen-induced regulatory CD8+ T cells. *J Immunol* 177: 2775-83
273. Hadley GA, Bartlett ST, Via CS, Rostapshova EA, Moainie S. 1997. The epithelial cell-specific integrin, CD103 (alpha E integrin), defines a novel subset of alloreactive CD8+ CTL. *J Immunol* 159: 3748-56
274. Koch SD, Uss E, van Lier RA, ten Berge IJ. 2008. Alloantigen-induced regulatory CD8+CD103+ T cells. *Hum Immunol* 69: 737-44
275. Ho J, Kurtz CC, Naganuma M, Ernst PB, Cominelli F, Rivera-Nieves J. 2008. A CD8+/CD103high T cell subset regulates TNF-mediated chronic murine ileitis. *J Immunol* 180: 2573-80
276. Lu L, Yu Y, Li G, Pu L, Zhang F, Zheng S, Wang X. 2009. CD8(+)CD103(+) regulatory T cells in spontaneous tolerance of liver allografts. *Int Immunopharmacol* 9: 546-8
277. Bienvenu B, Martin B, Auffray C, Cordier C, Becourt C, Lucas B. 2005. Peripheral CD8+CD25+ T lymphocytes from MHC class II-deficient mice exhibit regulatory activity. *J Immunol* 175: 246-53
278. Cosmi L, Liotta F, Lazzeri E, Francalanci M, Angeli R, Mazzinghi B, Santarlaschi V, Manetti R, Vanini V, Romagnani P, Maggi E, Romagnani S, Annunziato F. 2003. Human CD8+CD25+ thymocytes share phenotypic and functional features with CD4+CD25+ regulatory thymocytes. *Blood* 102: 4107-14
279. Joosten SA, van Meijgaarden KE, Savage ND, de Boer T, Triebel F, van der Wal A, de Heer E, Klein MR, Geluk A, Ottenhoff TH. 2007. Identification of a human CD8+



- regulatory T cell subset that mediates suppression through the chemokine CC chemokine ligand 4. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104: 8029-34
280. Mahic M, Henjum K, Yaqub S, Bjornbeth BA, Torgersen KM, Tasken K, Aandahl EM. 2008. Generation of highly suppressive adaptive CD8(+)CD25(+)FOXP3(+) regulatory T cells by continuous antigen stimulation. *Eur J Immunol* 38: 640-6
  281. Bisikirska B, Colgan J, Luban J, Bluestone JA, Herold KC. 2005. TCR stimulation with modified anti-CD3 mAb expands CD8+ T cell population and induces CD8+CD25+ Tregs. *J Clin Invest* 115: 2904-13
  282. Correale J, Villa A. 2010. Role of CD8+ CD25+ Foxp3+ regulatory T cells in multiple sclerosis. *Ann Neurol* 67: 625-38
  283. Westendorf AM, Fleissner D, Deppenmeier S, Gruber AD, Bruder D, Hansen W, Liblau R, Buer J. 2006. Autoimmune-mediated intestinal inflammation-impact and regulation of antigen-specific CD8+ T cells. *Gastroenterology* 131: 510-24
  284. Seo SK, Choi JH, Kim YH, Kang WJ, Park HY, Suh JH, Choi BK, Vinay DS, Kwon BS. 2004. 4-1BB-mediated immunotherapy of rheumatoid arthritis. *Nat Med* 10: 1088-94
  285. Choi BK, Asai T, Vinay DS, Kim YH, Kwon BS. 2006. 4-1BB-mediated amelioration of experimental autoimmune uveoretinitis is caused by indoleamine 2,3-dioxygenase-dependent mechanisms. *Cytokine* 34: 233-42
  286. Vinay DS, Kim CH, Choi BK, Kwon BS. 2009. Origins and functional basis of regulatory CD11c+CD8+ T cells. *Eur J Immunol* 39: 1552-63
  287. Le Gal FA, Riteau B, Sedlik C, Khalil-Daher I, Menier C, Dausset J, Guillet JG, Carosella ED, Rouas-Freiss N. 1999. HLA-G-mediated inhibition of antigen-specific cytotoxic T lymphocytes. *Int Immunol* 11: 1351-6
  288. Lila N, Rouas-Freiss N, Dausset J, Carpentier A, Carosella ED. 2001. Soluble HLA-G protein secreted by allo-specific CD4+ T cells suppresses the allo-proliferative response: a CD4+ T cell regulatory mechanism. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98: 12150-5
  289. Riteau B, Menier C, Khalil-Daher I, Sedlik C, Dausset J, Rouas-Freiss N, Carosella ED. 1999. HLA-G inhibits the allogeneic proliferative response. *J Reprod Immunol* 43: 203-11
  290. Feger U, Tolosa E, Huang YH, Waschbisch A, Biedermann T, Melms A, Wiendl H. 2007. HLA-G expression defines a novel regulatory T-cell subset present in human peripheral blood and sites of inflammation. *Blood* 110: 568-77
  291. Cai J, Lee J, Jankowska-Gan E, Derks R, Pool J, Mutis T, Goulmy E, Burlingham WJ. 2004. Minor H antigen HA-1-specific regulator and effector CD8+ T cells, and HA-1 microchimerism, in allograft tolerance. *J Exp Med* 199: 1017-23
  292. Wei S, Kryczek I, Zou L, Daniel B, Cheng P, Mottram P, Curiel T, Lange A, Zou W. 2005. Plasmacytoid dendritic cells induce CD8+ regulatory T cells in human ovarian carcinoma. *Cancer Res* 65: 5020-6
  293. Xystrakis E, Dejean AS, Bernard I, Druet P, Liblau R, Gonzalez-Dunia D, Saoudi A. 2004. Identification of a novel natural regulatory CD8 T-cell subset and analysis of its mechanism of regulation. *Blood* 104: 3294-301
  294. Guillot C, Guillonnet C, Mathieu P, Gerdes CA, Menoret S, Braudeau C, Tesson L, Renaudin K, Castro MG, Lowenstein PR, Anegon I. 2002. Prolonged blockade of CD40-CD40 ligand interactions by gene transfer of CD40Ig results in long-term heart allograft survival and donor-specific hyporesponsiveness, but does not prevent chronic rejection. *J Immunol* 168: 1600-9
  295. Li XL, Menoret S, Bezie S, Caron L, Chabannes D, Hill M, Halary F, Angin M, Heslan M, Usal C, Liang L, Guillonnet C, Le Mauff B, Cuturi MC, Josien R, Anegon I. 2010. Mechanism and localization of CD8 regulatory T cells in a heart transplant model of tolerance. *J Immunol* 185: 823-33

296. Guillonneau C, Hill M, Hubert FX, Chiffolleau E, Herve C, Li XL, Heslan M, Usal C, Tesson L, Menoret S, Saoudi A, Le Mauff B, Josien R, Cuturi MC, Anegon I. 2007. CD40lg treatment results in allograft acceptance mediated by CD8CD45RC T cells, IFN-gamma, and indoleamine 2,3-dioxygenase. *J Clin Invest* 117: 1096-106
297. Picarda E, Bezie S, Venturi V, Echasserieu K, Merieau E, Delhumeau A, Renaudin K, Brouard S, Bernardeau K, Anegon I, Guillonneau C. 2014. MHC-derived allopeptide activates TCR-biased CD8+ Tregs and suppresses organ rejection. *J Clin Invest* 124: 2497-512
298. Poussier P, Ning T, Banerjee D, Julius M. 2002. A unique subset of self-specific intrainestinal T cells maintains gut integrity. *J Exp Med* 195: 1491-7
299. Rocha B. 2007. The extrathymic T-cell differentiation in the murine gut. *Immunol Rev* 215: 166-77
300. Liu Z, Tugulea S, Cortesini R, Suci-Foca N. 1998. Specific suppression of T helper alloreactivity by allo-MHC class I-restricted CD8+CD28- T cells. *Int Immunol* 10: 775-83
301. Scotto L, Naiyer AJ, Galluzzo S, Rossi P, Manavalan JS, Kim-Schulze S, Fang J, Favera RD, Cortesini R, Suci-Foca N. 2004. Overlap between molecular markers expressed by naturally occurring CD4+CD25+ regulatory T cells and antigen specific CD4+CD25+ and CD8+CD28- T suppressor cells. *Hum Immunol* 65: 1297-306
302. Chang CC, Ciubotariu R, Manavalan JS, Yuan J, Colovai AI, Piazza F, Lederman S, Colonna M, Cortesini R, Dalla-Favera R, Suci-Foca N. 2002. Tolerization of dendritic cells by T(S) cells: the crucial role of inhibitory receptors ILT3 and ILT4. *Nat Immunol* 3: 237-43
303. Kim-Schulze S, Scotto L, Vlad G, Piazza F, Lin H, Liu Z, Cortesini R, Suci-Foca N. 2006. Recombinant Ig-like transcript 3-Fc modulates T cell responses via induction of Th anergy and differentiation of CD8+ T suppressor cells. *J Immunol* 176: 2790-8
304. Filaci G, Fenoglio D, Fravega M, Ansaldo G, Borgonovo G, Traverso P, Villaggio B, Ferrera A, Kunkl A, Rizzi M, Ferrera F, Balestra P, Ghio M, Contini P, Setti M, Olive D, Azzarone B, Carmignani G, Ravetti JL, Torre G, Indiveri F. 2007. CD8+ CD28- T regulatory lymphocytes inhibiting T cell proliferative and cytotoxic functions infiltrate human cancers. *Journal of immunology* 179: 4323-34
305. Crucian B, Dunne P, Friedman H, Ragsdale R, Pross S, Widen R. 1995. Alterations in levels of CD28-/CD8+ suppressor cell precursor and CD45RO+/CD4+ memory T lymphocytes in the peripheral blood of multiple sclerosis patients. *Clin Diagn Lab Immunol* 2: 249-52
306. Mikulkova Z, Praksova P, Stourac P, Bednarik J, Strajtova L, Pacasova R, Belobradkova J, Dite P, Michalek J. 2010. Numerical defects in CD8+CD28- T-suppressor lymphocyte population in patients with type 1 diabetes mellitus and multiple sclerosis. *Cell Immunol* 262: 75-9
307. Najafian N, Chitnis T, Salama AD, Zhu B, Benou C, Yuan X, Clarkson MR, Sayegh MH, Khoury SJ. 2003. Regulatory functions of CD8+CD28- T cells in an autoimmune disease model. *The Journal of clinical investigation* 112: 1037-48
308. Ben-David H, Sharabi A, Dayan M, Sela M, Mozes E. 2007. The role of CD8+CD28 regulatory cells in suppressing myasthenia gravis-associated responses by a dual altered peptide ligand. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104: 17459-64
309. Coombes JL, Robinson NJ, Maloy KJ, Uhlig HH, Powrie F. 2005. Regulatory T cells and intestinal homeostasis. *Immunol Rev* 204: 184-94
310. Menager-Marcq I, Pomie C, Romagnoli P, van Meerwijk JP. 2006. CD8+CD28-regulatory T lymphocytes prevent experimental inflammatory bowel disease in mice. *Gastroenterology* 131: 1775-85

311. Vlad G, Cortesini R, Suciu-Foca N. 2008. CD8+ T suppressor cells and the ILT3 master switch. *Human immunology* 69: 681-6
312. Akdis M, Verhagen J, Taylor A, Karamloo F, Karagiannidis C, Crameri R, Thunberg S, Deniz G, Valenta R, Fiebig H, Kegel C, Disch R, Schmidt-Weber CB, Blaser K, Akdis CA. 2004. Immune responses in healthy and allergic individuals are characterized by a fine balance between allergen-specific T regulatory 1 and T helper 2 cells. *J Exp Med* 199: 1567-75
313. Bacchetta R, Sartirana C, Levings MK, Bordignon C, Narula S, Roncarolo MG. 2002. Growth and expansion of human T regulatory type 1 cells are independent from TCR activation but require exogenous cytokines. *Eur J Immunol* 32: 2237-45
314. Groux H, O'Garra A, Bigler M, Rouleau M, Antonenko S, de Vries JE, Roncarolo MG. 1997. A CD4+ T-cell subset inhibits antigen-specific T-cell responses and prevents colitis. *Nature* 389: 737-42
315. Bynoe MS, Evans JT, Viret C, Janeway CA, Jr. 2003. Epicutaneous immunization with autoantigenic peptides induces T suppressor cells that prevent experimental allergic encephalomyelitis. *Immunity* 19: 317-28
316. Battaglia M, Stabilini A, Draghici E, Gregori S, Mocchetti C, Bonifacio E, Roncarolo MG. 2006. Rapamycin and interleukin-10 treatment induces T regulatory type 1 cells that mediate antigen-specific transplantation tolerance. *Diabetes* 55: 40-9
317. Bacchetta R, de Waal Malefijt R, Yssel H, Abrams J, de Vries JE, Spits H, Roncarolo MG. 1990. Host-reactive CD4+ and CD8+ T cell clones isolated from a human chimera produce IL-5, IL-2, IFN-gamma and granulocyte/macrophage-colony-stimulating factor but not IL-4. *J Immunol* 144: 902-8
318. Haringer B, Lozza L, Steckel B, Geginat J. 2009. Identification and characterization of IL-10/IFN-gamma-producing effector-like T cells with regulatory function in human blood. *J Exp Med* 206: 1009-17
319. Magnani CF, Alberigo G, Bacchetta R, Serafini G, Andreani M, Roncarolo MG, Gregori S. 2011. Killing of myeloid APCs via HLA class I, CD2 and CD226 defines a novel mechanism of suppression by human Tr1 cells. *Eur J Immunol* 41: 1652-62
320. Gagliani N, Magnani CF, Huber S, Gianolini ME, Pala M, Licona-Limon P, Guo B, Herbert DR, Bulfone A, Trentini F, Di Serio C, Bacchetta R, Andreani M, Brockmann L, Gregori S, Flavell RA, Roncarolo MG. 2013. Coexpression of CD49b and LAG-3 identifies human and mouse T regulatory type 1 cells. *Nat Med* 19: 739-46
321. Bendelac A, Savage PB, Teyton L. 2007. The biology of NKT cells. *Annu Rev Immunol* 25: 297-336
322. Bendelac A, Rivera MN, Park SH, Roark JH. 1997. Mouse CD1-specific NK1 T cells: development, specificity, and function. *Annu Rev Immunol* 15: 535-62
323. Terabe M, Swann J, Ambrosino E, Sinha P, Takaku S, Hayakawa Y, Godfrey DI, Ostrand-Rosenberg S, Smyth MJ, Berzofsky JA. 2005. A nonclassical non-Valpha14Jalpha18 CD1d-restricted (type II) NKT cell is sufficient for down-regulation of tumor immunosurveillance. *J Exp Med* 202: 1627-33
324. Hayday A, Tigelaar R. 2003. Immunoregulation in the tissues by gammadelta T cells. *Nat Rev Immunol* 3: 233-42
325. Born W, Cady C, Jones-Carson J, Mukasa A, Lahn M, O'Brien R. 1999. Immunoregulatory functions of gamma delta T cells. *Adv Immunol* 71: 77-144
326. Tsuchiya T, Fukuda S, Hamada H, Nakamura A, Kohama Y, Ishikawa H, Tsujikawa K, Yamamoto H. 2003. Role of gamma delta T cells in the inflammatory response of experimental colitis mice. *J Immunol* 171: 5507-13
327. Peng SL, Madaio MP, Hayday AC, Craft J. 1996. Propagation and regulation of systemic autoimmunity by gammadelta T cells. *J Immunol* 157: 5689-98

328. Peng G, Wang HY, Peng W, Kiniwa Y, Seo KH, Wang RF. 2007. Tumor-infiltrating gammadelta T cells suppress T and dendritic cell function via mechanisms controlled by a unique toll-like receptor signaling pathway. *Immunity* 27: 334-48
329. Rhodes KA, Andrew EM, Newton DJ, Tramonti D, Carding SR. 2008. A subset of IL-10-producing gammadelta T cells protect the liver from Listeria-elicited, CD8(+) T cell-mediated injury. *Eur J Immunol* 38: 2274-83
330. Vincent MS, Roessner K, Lynch D, Wilson D, Cooper SM, Tschopp J, Sigal LH, Budd RC. 1996. Apoptosis of Fashigh CD4+ synovial T cells by borrelia-reactive Fas-ligand(high) gamma delta T cells in Lyme arthritis. *J Exp Med* 184: 2109-17
331. Huber S, Shi C, Budd RC. 2002. Gammadelta T cells promote a Th1 response during coxsackievirus B3 infection in vivo: role of Fas and Fas ligand. *J Virol* 76: 6487-94
332. Fillatreau S, Sweenie CH, McGeachy MJ, Gray D, Anderton SM. 2002. B cells regulate autoimmunity by provision of IL-10. *Nat Immunol* 3: 944-50
333. Dang VD, Hilgenberg E, Ries S, Shen P, Fillatreau S. 2014. From the regulatory functions of B cells to the identification of cytokine-producing plasma cell subsets. *Curr Opin Immunol* 28C: 77-83
334. Wang RX, Yu CR, Dambuza IM, Mahdi RM, Dolinska MB, Sergeev YV, Wingfield PT, Kim SH, Egwuagu CE. 2014. Interleukin-35 induces regulatory B cells that suppress autoimmune disease. *Nat Med* 20: 633-41
335. Ohnmacht C, Pullner A, King SB, Drexler I, Meier S, Brocker T, Voehringer D. 2009. Constitutive ablation of dendritic cells breaks self-tolerance of CD4 T cells and results in spontaneous fatal autoimmunity. *J Exp Med* 206: 549-59
336. Ezzelarab M, Thomson AW. 2011. Tolerogenic dendritic cells and their role in transplantation. *Semin Immunol* 23: 252-63
337. Manicassamy S, Pulendran B. 2011. Dendritic cell control of tolerogenic responses. *Immunol Rev* 241: 206-27
338. Wood KJ, Bushell A, Hester J. 2012. Regulatory immune cells in transplantation. *Nat Rev Immunol* 12: 417-30
339. Jiang J, Guo W, Liang X. 2014. Phenotypes, accumulation, and functions of myeloid-derived suppressor cells and associated treatment strategies in cancer patients. *Hum Immunol*
340. Gabrilovich DI, Nagaraj S. 2009. Myeloid-derived suppressor cells as regulators of the immune system. *Nat Rev Immunol* 9: 162-74
341. Haile LA, von Wasielowski R, Gamrekashvili J, Kruger C, Bachmann O, Westendorf AM, Buer J, Liblau R, Manns MP, Korangy F, Greten TF. 2008. Myeloid-derived suppressor cells in inflammatory bowel disease: a new immunoregulatory pathway. *Gastroenterology* 135: 871-81, 81 e1-5
342. Chou HS, Hsieh CC, Charles R, Wang L, Wagner T, Fung JJ, Qian S, Lu LL. 2012. Myeloid-derived suppressor cells protect islet transplants by B7-H1 mediated enhancement of T regulatory cells. *Transplantation* 93: 272-82
343. Garcia MR, Ledgerwood L, Yang Y, Xu J, Lal G, Burrell B, Ma G, Hashimoto D, Li Y, Boros P, Grisotto M, van Rooijen N, Matesanz R, Tacke F, Ginhoux F, Ding Y, Chen SH, Randolph G, Merad M, Bromberg JS, Ochando JC. 2010. Monocytic suppressive cells mediate cardiovascular transplantation tolerance in mice. *J Clin Invest* 120: 2486-96
344. Dugast AS, Haudebourg T, Coulon F, Heslan M, Haspot F, Poirier N, Vuillefroy de Silly R, Usal C, Smit H, Martinet B, Thebault P, Renaudin K, Vanhove B. 2008. Myeloid-derived suppressor cells accumulate in kidney allograft tolerance and specifically suppress effector T cell expansion. *J Immunol* 180: 7898-906
345. Murray PJ, Wynn TA. 2011. Protective and pathogenic functions of macrophage subsets. *Nat Rev Immunol* 11: 723-37



346. Li XC. 2010. The significance of non-T-cell pathways in graft rejection: implications for transplant tolerance. *Transplantation* 90: 1043-7
347. Hutchinson JA, Riquelme P, Sawitzki B, Tomiuk S, Miqueu P, Zuhayra M, Oberg HH, Pascher A, Lutzen U, Janssen U, Broichhausen C, Renders L, Thaiss F, Scheuermann E, Henze E, Volk HD, Chatenoud L, Lechler RI, Wood KJ, Kabelitz D, Schlitt HJ, Geissler EK, Fandrich F. 2011. Cutting Edge: Immunological consequences and trafficking of human regulatory macrophages administered to renal transplant recipients. *J Immunol* 187: 2072-8
348. Hashimoto D, Chow A, Greter M, Saenger Y, Kwan WH, Leboeuf M, Ginhoux F, Ochando JC, Kunisaki Y, van Rooijen N, Liu C, Teshima T, Heeger PS, Stanley ER, Frenette PS, Merad M. 2011. Pretransplant CSF-1 therapy expands recipient macrophages and ameliorates GVHD after allogeneic hematopoietic cell transplantation. *J Exp Med* 208: 1069-82
349. Gallegos AM, Bevan MJ. 2006. Central tolerance: good but imperfect. *Immunol Rev* 209: 290-6
350. Nagamine K, Peterson P, Scott HS, Kudoh J, Minoshima S, Heino M, Krohn KJ, Lalioti MD, Mullis PE, Antonarakis SE, Kawasaki K, Asakawa S, Ito F, Shimizu N. 1997. Positional cloning of the APECED gene. *Nat Genet* 17: 393-8
351. Kisand K, Boe Wolff AS, Podkrajsek KT, Tserel L, Link M, Kisand KV, Ersvaer E, Perheentupa J, Erichsen MM, Bratanic N, Meloni A, Cetani F, Perniola R, Ergun-Longmire B, Maclaren N, Krohn KJ, Pura M, Schalke B, Strobel P, Leite MI, Battelino T, Husebye ES, Peterson P, Willcox N, Meager A. 2010. Chronic mucocutaneous candidiasis in APECED or thymoma patients correlates with autoimmunity to Th17-associated cytokines. *J Exp Med* 207: 299-308
352. Perheentupa J. 2006. Autoimmune polyendocrinopathy-candidiasis-ectodermal dystrophy. *J Clin Endocrinol Metab* 91: 2843-50
353. Peterson P, Peltonen L. 2005. Autoimmune polyendocrinopathy syndrome type 1 (APS1) and AIRE gene: new views on molecular basis of autoimmunity. *J Autoimmun* 25 Suppl: 49-55
354. Venanzi ES, Melamed R, Mathis D, Benoist C. 2008. The variable immunological self: genetic variation and nongenetic noise in Aire-regulated transcription. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105: 15860-5
355. Derbinski J, Gabler J, Brors B, Tierling S, Jonnakuty S, Hergenhausen M, Peltonen L, Walter J, Kyewski B. 2005. Promiscuous gene expression in thymic epithelial cells is regulated at multiple levels. *J Exp Med* 202: 33-45
356. Heino M, Peterson P, Kudoh J, Nagamine K, Lagerstedt A, Ovod V, Ranki A, Rantala I, Nieminen M, Tuukkanen J, Scott HS, Antonarakis SE, Shimizu N, Krohn K. 1999. Autoimmune regulator is expressed in the cells regulating immune tolerance in thymus medulla. *Biochem Biophys Res Commun* 257: 821-5
357. Bjorses P, Peltto-Huikko M, Kaukonen J, Aaltonen J, Peltonen L, Ulmanen I. 1999. Localization of the APECED protein in distinct nuclear structures. *Hum Mol Genet* 8: 259-66
358. Everett RD, Chelbi-Alix MK. 2007. PML and PML nuclear bodies: implications in antiviral defence. *Biochimie* 89: 819-30
359. Johnnidis JB, Venanzi ES, Taxman DJ, Ting JP, Benoist CO, Mathis DJ. 2005. Chromosomal clustering of genes controlled by the aire transcription factor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102: 7233-8
360. Ramsey C, Bukrinsky A, Peltonen L. 2002. Systematic mutagenesis of the functional domains of AIRE reveals their role in intracellular targeting. *Hum Mol Genet* 11: 3299-308
361. Bottomley MJ, Stier G, Pennacchini D, Legube G, Simon B, Akhtar A, Sattler M, Musco G. 2005. NMR structure of the first PHD finger of autoimmune regulator

- protein (AIRE1). Insights into autoimmune polyendocrinopathy-candidiasis-ectodermal dystrophy (APECED) disease. *J Biol Chem* 280: 11505-12
362. Zumer K, Plemenitas A, Saksela K, Peterlin BM. 2011. Patient mutation in AIRE disrupts P-TEFb binding and target gene transcription. *Nucleic Acids Res* 39: 7908-19
  363. Zumer K, Low AK, Jiang H, Saksela K, Peterlin BM. 2012. Unmodified histone H3K4 and DNA-dependent protein kinase recruit autoimmune regulator to target genes. *Mol Cell Biol* 32: 1354-62
  364. Org T, Chignola F, Hetenyi C, Gaetani M, Rebane A, Liiv I, Maran U, Mollica L, Bottomley MJ, Musco G, Peterson P. 2008. The autoimmune regulator PHD finger binds to non-methylated histone H3K4 to activate gene expression. *EMBO Rep* 9: 370-6
  365. Koh AS, Kuo AJ, Park SY, Cheung P, Abramson J, Bua D, Carney D, Shoelson SE, Gozani O, Kingston RE, Benoist C, Mathis D. 2008. Aire employs a histone-binding module to mediate immunological tolerance, linking chromatin regulation with organ-specific autoimmunity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105: 15878-83
  366. Liiv I, Rebane A, Org T, Saare M, Maslovskaja J, Kisand K, Juronen E, Valmu L, Bottomley MJ, Kalkkinen N, Peterson P. 2008. DNA-PK contributes to the phosphorylation of AIRE: importance in transcriptional activity. *Biochim Biophys Acta* 1783: 74-83
  367. Hill R, Lee PW. 2010. The DNA-dependent protein kinase (DNA-PK): More than just a case of making ends meet? *Cell Cycle* 9: 3460-9
  368. Oven I, Brdickova N, Kohoutek J, Vaupotic T, Narat M, Peterlin BM. 2007. AIRE recruits P-TEFb for transcriptional elongation of target genes in medullary thymic epithelial cells. *Mol Cell Biol* 27: 8815-23
  369. Peterlin BM, Price DH. 2006. Controlling the elongation phase of transcription with P-TEFb. *Mol Cell* 23: 297-305
  370. Peng J, Zhu Y, Milton JT, Price DH. 1998. Identification of multiple cyclin subunits of human P-TEFb. *Genes Dev* 12: 755-62
  371. Core LJ, Waterfall JJ, Lis JT. 2008. Nascent RNA sequencing reveals widespread pausing and divergent initiation at human promoters. *Science* 322: 1845-8
  372. Nechaev S, Fargo DC, dos Santos G, Liu L, Gao Y, Adelman K. 2010. Global analysis of short RNAs reveals widespread promoter-proximal stalling and arrest of Pol II in *Drosophila*. *Science* 327: 335-8
  373. Guenther MG, Levine SS, Boyer LA, Jaenisch R, Young RA. 2007. A chromatin landmark and transcription initiation at most promoters in human cells. *Cell* 130: 77-88
  374. Giraud M, Yoshida H, Abramson J, Rahl PB, Young RA, Mathis D, Benoist C. 2012. Aire unleashes stalled RNA polymerase to induce ectopic gene expression in thymic epithelial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 109: 535-40
  375. Hargreaves DC, Horng T, Medzhitov R. 2009. Control of inducible gene expression by signal-dependent transcriptional elongation. *Cell* 138: 129-45
  376. Liston A, Lesage S, Wilson J, Peltonen L, Goodnow CC. 2003. Aire regulates negative selection of organ-specific T cells. *Nat Immunol* 4: 350-4
  377. Anderson MS, Venanzi ES, Chen Z, Berzins SP, Benoist C, Mathis D. 2005. The cellular mechanism of Aire control of T cell tolerance. *Immunity* 23: 227-39
  378. DeVoss J, Hou Y, Johannes K, Lu W, Liou GI, Rinn J, Chang H, Caspi RR, Fong L, Anderson MS. 2006. Spontaneous autoimmunity prevented by thymic expression of a single self-antigen. *J Exp Med* 203: 2727-35
  379. Hou Y, DeVoss J, Dao V, Kwek S, Simko JP, McNeel DG, Anderson MS, Fong L. 2009. An aberrant prostate antigen-specific immune response causes prostatitis in mice and is associated with chronic prostatitis in humans. *J Clin Invest* 119: 2031-41

380. Shum AK, DeVoss J, Tan CL, Hou Y, Johannes K, O'Gorman CS, Jones KD, Sochett EB, Fong L, Anderson MS. 2009. Identification of an autoantigen demonstrates a link between interstitial lung disease and a defect in central tolerance. *Sci Transl Med* 1: 9ra20
381. Peterson P, Org T, Rebane A. 2008. Transcriptional regulation by AIRE: molecular mechanisms of central tolerance. *Nat Rev Immunol* 8: 948-57
382. Hubert FX, Kinkel SA, Webster KE, Cannon P, Crewther PE, Proeitto AI, Wu L, Heath WR, Scott HS. 2008. A specific anti-Aire antibody reveals aire expression is restricted to medullary thymic epithelial cells and not expressed in periphery. *J Immunol* 180: 3824-32
383. Kuroda N, Mitani T, Takeda N, Ishimaru N, Arakaki R, Hayashi Y, Bando Y, Izumi K, Takahashi T, Nomura T, Sakaguchi S, Ueno T, Takahama Y, Uchida D, Sun S, Kajiura F, Mouri Y, Han H, Matsushima A, Yamada G, Matsumoto M. 2005. Development of autoimmunity against transcriptionally unrepressed target antigen in the thymus of Aire-deficient mice. *J Immunol* 174: 1862-70
384. Niki S, Oshikawa K, Mouri Y, Hirota F, Matsushima A, Yano M, Han H, Bando Y, Izumi K, Matsumoto M, Nakayama KI, Kuroda N, Matsumoto M. 2006. Alteration of intra-pancreatic target-organ specificity by abrogation of Aire in NOD mice. *J Clin Invest* 116: 1292-301
385. Davalos-Misslitz AC, Rieckenberg J, Willenzon S, Worbs T, Kremmer E, Bernhardt G, Forster R. 2007. Generalized multi-organ autoimmunity in CCR7-deficient mice. *Eur J Immunol* 37: 613-22
386. Laan M, Kisand K, Kont V, Moll K, Tserel L, Scott HS, Peterson P. 2009. Autoimmune regulator deficiency results in decreased expression of CCR4 and CCR7 ligands and in delayed migration of CD4+ thymocytes. *J Immunol* 183: 7682-91
387. Lei Y, Ripen AM, Ishimaru N, Ohigashi I, Nagasawa T, Jeker LT, Bosl MR, Hollander GA, Hayashi Y, Malefyt Rde W, Nitta T, Takahama Y. 2011. Aire-dependent production of XCL1 mediates medullary accumulation of thymic dendritic cells and contributes to regulatory T cell development. *J Exp Med* 208: 383-94
388. Gray D, Abramson J, Benoist C, Mathis D. 2007. Proliferative arrest and rapid turnover of thymic epithelial cells expressing Aire. *J Exp Med* 204: 2521-8
389. Gillard GO, Dooley J, Erickson M, Peltonen L, Farr AG. 2007. Aire-dependent alterations in medullary thymic epithelium indicate a role for Aire in thymic epithelial differentiation. *J Immunol* 178: 3007-15
390. Dooley J, Erickson M, Farr AG. 2008. Alterations of the medullary epithelial compartment in the Aire-deficient thymus: implications for programs of thymic epithelial differentiation. *J Immunol* 181: 5225-32
391. Wada N, Nishifuji K, Yamada T, Kudoh J, Shimizu N, Matsumoto M, Peltonen L, Nagafuchi S, Amagai M. 2011. Aire-dependent thymic expression of desmoglein 3, the autoantigen in pemphigus vulgaris, and its role in T-cell tolerance. *J Invest Dermatol* 131: 410-7
392. Aschenbrenner K, D'Cruz LM, Vollmann EH, Hinterberger M, Emmerich J, Swee LK, Rolink A, Klein L. 2007. Selection of Foxp3+ regulatory T cells specific for self antigen expressed and presented by Aire+ medullary thymic epithelial cells. *Nat Immunol* 8: 351-8
393. Daniely D, Kern J, Cebula A, Ignatowicz L. 2010. Diversity of TCRs on natural Foxp3+ T cells in mice lacking Aire expression. *J Immunol* 184: 6865-73
394. Kekalainen E, Tuovinen H, Joensuu J, Gylling M, Franssila R, Pontynen N, Talvensaari K, Perheentupa J, Miettinen A, Arstila TP. 2007. A defect of regulatory T cells in patients with autoimmune polyendocrinopathy-candidiasis-ectodermal dystrophy. *J Immunol* 178: 1208-15

395. Gardner JM, Devoss JJ, Friedman RS, Wong DJ, Tan YX, Zhou X, Johannes KP, Su MA, Chang HY, Krummel MF, Anderson MS. 2008. Deletional tolerance mediated by extrathymic Aire-expressing cells. *Science* 321: 843-7
396. Poliani PL, Kisand K, Marrella V, Ravanini M, Notarangelo LD, Villa A, Peterson P, Facchetti F. 2010. Human peripheral lymphoid tissues contain autoimmune regulator-expressing dendritic cells. *Am J Pathol* 176: 1104-12
397. Lloyd CM, Hessel EM. 2010. Functions of T cells in asthma: more than just T(H)2 cells. *Nat Rev Immunol* 10: 838-48
398. Mischke D, Korge BP, Marenholz I, Volz A, Ziegler A. 1996. Genes encoding structural proteins of epidermal cornification and S100 calcium-binding proteins form a gene complex ("epidermal differentiation complex") on human chromosome 1q21. *J Invest Dermatol* 106: 989-92
399. Laitinen T, Polvi A, Rydman P, Vendelin J, Pulkkinen V, Salmikangas P, Makela S, Rehn M, Pirskanen A, Rautanen A, Zucchelli M, Gullsten H, Leino M, Alenius H, Petays T, Haahtela T, Laitinen A, Laprise C, Hudson TJ, Laitinen LA, Kere J. 2004. Characterization of a common susceptibility locus for asthma-related traits. *Science* 304: 300-4
400. Kabesch M, Peters W, Carr D, Leupold W, Weiland SK, von Mutius E. 2003. Association between polymorphisms in caspase recruitment domain containing protein 15 and allergy in two German populations. *J Allergy Clin Immunol* 111: 813-7
401. Baldini M, Lohman IC, Halonen M, Erickson RP, Holt PG, Martinez FD. 1999. A Polymorphism\* in the 5' flanking region of the CD14 gene is associated with circulating soluble CD14 levels and with total serum immunoglobulin E. *Am J Respir Cell Mol Biol* 20: 976-83
402. Eder W, Klimecki W, Yu L, von Mutius E, Riedler J, Braun-Fahrlander C, Nowak D, Martinez FD, Team AS. 2004. Toll-like receptor 2 as a major gene for asthma in children of European farmers. *J Allergy Clin Immunol* 113: 482-8
403. Lazarus R, Raby BA, Lange C, Silverman EK, Kwiatkowski DJ, Vercelli D, Klimecki WJ, Martinez FD, Weiss ST. 2004. TOLL-like receptor 10 genetic variation is associated with asthma in two independent samples. *Am J Respir Crit Care Med* 170: 594-600
404. Kuperman DA, Huang X, Koth LL, Chang GH, Dolganov GM, Zhu Z, Elias JA, Sheppard D, Erle DJ. 2002. Direct effects of interleukin-13 on epithelial cells cause airway hyperreactivity and mucus overproduction in asthma. *Nat Med* 8: 885-9
405. Pulleyn LJ, Newton R, Adcock IM, Barnes PJ. 2001. TGFbeta1 allele association with asthma severity. *Hum Genet* 109: 623-7
406. Moffatt MF, Cookson WO. 1997. Tumour necrosis factor haplotypes and asthma. *Hum Mol Genet* 6: 551-4
407. Martinez FD, Vercelli D. 2013. Asthma. *Lancet* 382: 1360-72
408. Stefanowicz D, Hackett TL, Garmaroudi FS, Gunther OP, Neumann S, Sutanto EN, Ling KM, Kobor MS, Kicic A, Stick SM, Pare PD, Knight DA. 2012. DNA methylation profiles of airway epithelial cells and PBMCs from healthy, atopic and asthmatic children. *PLoS One* 7: e44213
409. Zhu Z, Enhorning G, Zheng T, Chen Q, Chen NY, Homer R, Elias JA. 2003. Interleukin-13 induces surfactant function abnormality in the murine lung. *Chest* 123: 375S-6S
410. Lanningham-Foster L, Green CL, Langkamp-Henken B, Davis BA, Nguyen KT, Bender BS, Cousins RJ. 2002. Overexpression of CRIP in transgenic mice alters cytokine patterns and the immune response. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 282: E1197-203



411. Bleck B, Grunig G, Chiu A, Liu M, Gordon T, Kazeros A, Reibman J. 2013. MicroRNA-375 regulation of thymic stromal lymphopoietin by diesel exhaust particles and ambient particulate matter in human bronchial epithelial cells. *J Immunol* 190: 3757-63
412. Nicholson KG, Kent J, Ireland DC. 1993. Respiratory viruses and exacerbations of asthma in adults. *BMJ* 307: 982-6
413. Contoli M, Message SD, Laza-Stanca V, Edwards MR, Wark PA, Bartlett NW, Keadze T, Mallia P, Stanciu LA, Parker HL, Slater L, Lewis-Antes A, Kon OM, Holgate ST, Davies DE, Kolenko SV, Papi A, Johnston SL. 2006. Role of deficient type III interferon-lambda production in asthma exacerbations. *Nat Med* 12: 1023-6
414. Talbot TR, Hartert TV, Mitchel E, Halasa NB, Arbogast PG, Poehling KA, Schaffner W, Craig AS, Griffin MR. 2005. Asthma as a risk factor for invasive pneumococcal disease. *N Engl J Med* 352: 2082-90
415. Holgate ST. 2012. Innate and adaptive immune responses in asthma. *Nat Med* 18: 673-83
416. Trompette A, Divanovic S, Visintin A, Blanchard C, Hegde RS, Madan R, Thorne PS, Wills-Karp M, Gioannini TL, Weiss JP, Karp CL. 2009. Allergenicity resulting from functional mimicry of a Toll-like receptor complex protein. *Nature* 457: 585-8
417. Van Dyken SJ, Garcia D, Porter P, Huang X, Quinlan PJ, Blanc PD, Corry DB, Locksley RM. 2011. Fungal chitin from asthma-associated home environments induces eosinophilic lung infiltration. *J Immunol* 187: 2261-7
418. Osterlund C, Gronlund H, Polovic N, Sundstrom S, Gafvelin G, Bucht A. 2009. The non-proteolytic house dust mite allergen Der p 2 induce NF-kappaB and MAPK dependent activation of bronchial epithelial cells. *Clin Exp Allergy* 39: 1199-208
419. Osterlund C, Gronlund H, Gafvelin G, Bucht A. 2011. Non-proteolytic aeroallergens from mites, cat and dog exert adjuvant-like activation of bronchial epithelial cells. *Int Arch Allergy Immunol* 155: 111-8
420. Xing Z, Ohkawara Y, Jordana M, Graham F, Gauldie J. 1996. Transfer of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor gene to rat lung induces eosinophilia, monocytosis, and fibrotic reactions. *J Clin Invest* 97: 1102-10
421. Adach K, Suzuki M, Sugimoto T, Suzuki S, Niki R, Oyama A, Uetsuka K, Nakamaya H, Doi K. 2002. Granulocyte colony-stimulating factor exacerbates the acute lung injury and pulmonary fibrosis induced by intratracheal administration of bleomycin in rats. *Exp Toxicol Pathol* 53: 501-10
422. Cates EC, Gajewska BU, Goncharova S, Alvarez D, Fattouh R, Coyle AJ, Gutierrez-Ramos JC, Jordana M. 2003. Effect of GM-CSF on immune, inflammatory, and clinical responses to ragweed in a novel mouse model of mucosal sensitization. *J Allergy Clin Immunol* 111: 1076-86
423. Su YC, Rolph MS, Hansbro NG, Mackay CR, Sewell WA. 2008. Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor is required for bronchial eosinophilia in a murine model of allergic airway inflammation. *J Immunol* 180: 2600-7
424. Moffatt MF, Gut IG, Demenais F, Strachan DP, Bouzigon E, Heath S, von Mutius E, Farrall M, Lathrop M, Cookson WO, Consortium G. 2010. A large-scale, consortium-based genomewide association study of asthma. *N Engl J Med* 363: 1211-21
425. Hirota T, Takahashi A, Kubo M, Tsunoda T, Tomita K, Doi S, Fujita K, Miyatake A, Enomoto T, Miyagawa T, Adachi M, Tanaka H, Niimi A, Matsumoto H, Ito I, Masuko H, Sakamoto T, Hizawa N, Taniguchi M, Lima JJ, Irvin CG, Peters SP, Himes BE, Litonjua AA, Tantisira KG, Weiss ST, Kamatani N, Nakamura Y, Tamari M. 2011. Genome-wide association study identifies three new susceptibility loci for adult asthma in the Japanese population. *Nat Genet* 43: 893-6

426. Torgerson DG, Ampleford EJ, Chiu GY, Gauderman WJ, Gignoux CR, Graves PE, Himes BE, Levin AM, Mathias RA, Hancock DB, Baurley JW, Eng C, Stern DA, Celedon JC, Rafaels N, Capurso D, Conti DV, Roth LA, Soto-Quiros M, Togias A, Li X, Myers RA, Romieu I, Van Den Berg DJ, Hu D, Hansel NN, Hernandez RD, Israel E, Salam MT, Galanter J, Avila PC, Avila L, Rodriguez-Santana JR, Chapela R, Rodriguez-Cintron W, Diette GB, Adkinson NF, Abel RA, Ross KD, Shi M, Faruque MU, Dunston GM, Watson HR, Mantese VJ, Ezurum SC, Liang L, Ruczinski I, Ford JG, Huntsman S, Chung KF, Vora H, Li X, Calhoun WJ, Castro M, Sienra-Monge JJ, del Rio-Navarro B, Deichmann KA, Heinzmann A, Wenzel SE, Busse WW, Gern JE, Lemanske RF, Jr., Beaty TH, Bleecker ER, Raby BA, Meyers DA, London SJ, Mexico City Childhood Asthma S, Gilliland FD, Children's Health S, study H, Burchard EG, Genetics of Asthma in Latino Americans Study SoG-E, Admixture in Latino A, Study of African Americans AG, Environments, Martinez FD, Childhood Asthma R, Education N, Weiss ST, Childhood Asthma Management P, Williams LK, Study of Asthma P, Pharmacogenomic Interactions by R-E, Barnes KC, Genetic Research on Asthma in African Diaspora S, Ober C, Nicolae DL. 2011. Meta-analysis of genome-wide association studies of asthma in ethnically diverse North American populations. *Nat Genet* 43: 887-92
427. Shikotra A, Choy DF, Ohri CM, Doran E, Butler C, Hargadon B, Shelley M, Abbas AR, Austin CD, Jackman J, Wu LC, Heaney LG, Arron JR, Bradding P. 2012. Increased expression of immunoreactive thymic stromal lymphopoietin in patients with severe asthma. *J Allergy Clin Immunol* 129: 104-11 e1-9
428. Chen ZG, Zhang TT, Li HT, Chen FH, Zou XL, Ji JZ, Chen H. 2013. Neutralization of TSLP inhibits airway remodeling in a murine model of allergic asthma induced by chronic exposure to house dust mite. *PLoS One* 8: e51268
429. Lei L, Zhang Y, Yao W, Kaplan MH, Zhou B. 2011. Thymic stromal lymphopoietin interferes with airway tolerance by suppressing the generation of antigen-specific regulatory T cells. *J Immunol* 186: 2254-61
430. Angkasekwinai P, Park H, Wang YH, Wang YH, Chang SH, Corry DB, Liu YJ, Zhu Z, Dong C. 2007. Interleukin 25 promotes the initiation of proallergic type 2 responses. *J Exp Med* 204: 1509-17
431. Kaiko GE, Phipps S, Angkasekwinai P, Dong C, Foster PS. 2010. NK cell deficiency predisposes to viral-induced Th2-type allergic inflammation via epithelial-derived IL-25. *J Immunol* 185: 4681-90
432. Corrigan CJ, Wang W, Meng Q, Fang C, Wu H, Reay V, Lv Z, Fan Y, An Y, Wang YH, Liu YJ, Lee TH, Ying S. 2011. T-helper cell type 2 (Th2) memory T cell-potentiating cytokine IL-25 has the potential to promote angiogenesis in asthma. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108: 1579-84
433. Corrigan CJ, Wang W, Meng Q, Fang C, Eid G, Caballero MR, Lv Z, An Y, Wang YH, Liu YJ, Kay AB, Lee TH, Ying S. 2011. Allergen-induced expression of IL-25 and IL-25 receptor in atopic asthmatic airways and late-phase cutaneous responses. *J Allergy Clin Immunol* 128: 116-24
434. Ballantyne SJ, Barlow JL, Jolin HE, Nath P, Williams AS, Chung KF, Sturton G, Wong SH, McKenzie AN. 2007. Blocking IL-25 prevents airway hyperresponsiveness in allergic asthma. *J Allergy Clin Immunol* 120: 1324-31
435. Kouzaki H, Iijima K, Kobayashi T, O'Grady SM, Kita H. 2011. The danger signal, extracellular ATP, is a sensor for an airborne allergen and triggers IL-33 release and innate Th2-type responses. *J Immunol* 186: 4375-87
436. Beamer CA, Girtsman TA, Seaver BP, Finsaas KJ, Migliaccio CT, Perry VK, Rottman JB, Smith DE, Holian A. 2013. IL-33 mediates multi-walled carbon nanotube (MWCNT)-induced airway hyper-reactivity via the mobilization of innate helper cells in the lung. *Nanotoxicology* 7: 1070-81

437. Tsicopoulos A, de Nadai P, Glineur C. 2013. Environmental and genetic contribution in airway epithelial barrier in asthma pathogenesis. *Curr Opin Allergy Clin Immunol* 13: 495-9
438. Schmitz J, Owyang A, Oldham E, Song Y, Murphy E, McClanahan TK, Zurawski G, Moshrefi M, Qin J, Li X, Gorman DM, Bazan JF, Kastelein RA. 2005. IL-33, an interleukin-1-like cytokine that signals via the IL-1 receptor-related protein ST2 and induces T helper type 2-associated cytokines. *Immunity* 23: 479-90
439. Besnard AG, Togbe D, Guillou N, Erard F, Quesniaux V, Ryffel B. 2011. IL-33-activated dendritic cells are critical for allergic airway inflammation. *Eur J Immunol* 41: 1675-86
440. Wang YH, Liu YJ. 2009. Thymic stromal lymphopoietin, OX40-ligand, and interleukin-25 in allergic responses. *Clin Exp Allergy* 39: 798-806
441. Liu YJ. 2007. Thymic stromal lymphopoietin and OX40 ligand pathway in the initiation of dendritic cell-mediated allergic inflammation. *J Allergy Clin Immunol* 120: 238-44; quiz 45-6
442. Nathan AT, Peterson EA, Chakir J, Wills-Karp M. 2009. Innate immune responses of airway epithelium to house dust mite are mediated through beta-glucan-dependent pathways. *J Allergy Clin Immunol* 123: 612-8
443. Pichavant M, Charbonnier AS, Taront S, Briche A, Wallaert B, Pestel J, Tonnel AB, Gosset P. 2005. Asthmatic bronchial epithelium activated by the proteolytic allergen Der p 1 increases selective dendritic cell recruitment. *J Allergy Clin Immunol* 115: 771-8
444. Wikstrom ME, Stumbles PA. 2007. Mouse respiratory tract dendritic cell subsets and the immunological fate of inhaled antigens. *Immunol Cell Biol* 85: 182-8
445. Demedts IK, Brusselle GG, Vermaelen KY, Pauwels RA. 2005. Identification and characterization of human pulmonary dendritic cells. *Am J Respir Cell Mol Biol* 32: 177-84
446. Hintzen G, Ohl L, del Rio ML, Rodriguez-Barbosa JL, Pabst O, Kocks JR, Krege J, Hardtke S, Forster R. 2006. Induction of tolerance to innocuous inhaled antigen relies on a CCR7-dependent dendritic cell-mediated antigen transport to the bronchial lymph node. *J Immunol* 177: 7346-54
447. van Rijt LS, Jung S, Kleinjan A, Vos N, Willart M, Duez C, Hoogsteden HC, Lambrecht BN. 2005. In vivo depletion of lung CD11c+ dendritic cells during allergen challenge abrogates the characteristic features of asthma. *J Exp Med* 201: 981-91
448. Muro S, Minshall EM, Hamid QA. 2000. The pathology of chronic asthma. *Clin Chest Med* 21: 225-44
449. Bentley AM, Kay AB, Durham SR. 1997. Human late asthmatic reactions. *Clin Exp Allergy* 27 Suppl 1: 71-86
450. Mathew A, MacLean JA, DeHaan E, Tager AM, Green FH, Luster AD. 2001. Signal transducer and activator of transcription 6 controls chemokine production and T helper cell type 2 cell trafficking in allergic pulmonary inflammation. *J Exp Med* 193: 1087-96
451. Mathew A, Medoff BD, Carafone AD, Luster AD. 2002. Cutting edge: Th2 cell trafficking into the allergic lung is dependent on chemoattractant receptor signaling. *J Immunol* 169: 651-5
452. Tager AM, Bromley SK, Medoff BD, Islam SA, Bercury SD, Friedrich EB, Carafone AD, Gerszten RE, Luster AD. 2003. Leukotriene B4 receptor BLT1 mediates early effector T cell recruitment. *Nat Immunol* 4: 982-90
453. Medoff BD, Tager AM, Jackobek R, Means TK, Wang L, Luster AD. 2006. Antibody-antigen interaction in the airway drives early granulocyte recruitment through BLT1. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 290: L170-8

454. Gonzalo JA, Qiu Y, Lora JM, Al-Garawi A, Villeval JL, Boyce JA, Martinez AC, Marquez G, Goya I, Hamid Q, Fraser CC, Picarella D, Cote-Sierra J, Hodge MR, Gutierrez-Ramos JC, Kolbeck R, Coyle AJ. 2007. Coordinated involvement of mast cells and T cells in allergic mucosal inflammation: critical role of the CC chemokine ligand 1:CCR8 axis. *J Immunol* 179: 1740-50
455. Oliveira SH, Lukacs NW. 2001. Stem cell factor and IgE-stimulated murine mast cells produce chemokines (CCL2, CCL17, CCL22) and express chemokine receptors. *Inflamm Res* 50: 168-74
456. Hirai H, Tanaka K, Yoshie O, Ogawa K, Kenmotsu K, Takamori Y, Ichimasa M, Sugamura K, Nakamura M, Takano S, Nagata K. 2001. Prostaglandin D2 selectively induces chemotaxis in T helper type 2 cells, eosinophils, and basophils via seven-transmembrane receptor CRTH2. *J Exp Med* 193: 255-61
457. Medoff BD, Thomas SY, Luster AD. 2008. T cell trafficking in allergic asthma: the ins and outs. *Annu Rev Immunol* 26: 205-32
458. Reibman J, Hsu Y, Chen LC, Bleck B, Gordon T. 2003. Airway epithelial cells release MIP-3 $\alpha$ /CCL20 in response to cytokines and ambient particulate matter. *Am J Respir Cell Mol Biol* 28: 648-54
459. Kawai T, Takeuchi O, Fujita T, Inoue J, Muhlradt PF, Sato S, Hoshino K, Akira S. 2001. Lipopolysaccharide stimulates the MyD88-independent pathway and results in activation of IFN-regulatory factor 3 and the expression of a subset of lipopolysaccharide-inducible genes. *J Immunol* 167: 5887-94
460. Lukacs NW, Prosser DM, Wiekowski M, Lira SA, Cook DN. 2001. Requirement for the chemokine receptor CCR6 in allergic pulmonary inflammation. *J Exp Med* 194: 551-5
461. Lundy SK, Lira SA, Smit JJ, Cook DN, Berlin AA, Lukacs NW. 2005. Attenuation of allergen-induced responses in CCR6 $^{-/-}$  mice is dependent upon altered pulmonary T lymphocyte activation. *J Immunol* 174: 2054-60
462. Medoff BD, Sauty A, Tager AM, Maclean JA, Smith RN, Mathew A, Dufour JH, Luster AD. 2002. IFN- $\gamma$ -inducible protein 10 (CXCL10) contributes to airway hyperreactivity and airway inflammation in a mouse model of asthma. *J Immunol* 168: 5278-86
463. Islam SA, Luster AD. 2012. T cell homing to epithelial barriers in allergic disease. *Nat Med* 18: 705-15
464. Iellem A, Mariani M, Lang R, Recalde H, Panina-Bordignon P, Sinigaglia F, D'Ambrosio D. 2001. Unique chemotactic response profile and specific expression of chemokine receptors CCR4 and CCR8 by CD4(+)CD25(+) regulatory T cells. *J Exp Med* 194: 847-53
465. Galli SJ, Tsai M. 2012. IgE and mast cells in allergic disease. *Nat Med* 18: 693-704
466. Deckers J, Branco Madeira F, Hammad H. 2013. Innate immune cells in asthma. *Trends Immunol* 34: 540-7
467. Galli SJ, Tsai M. 2010. Mast cells in allergy and infection: versatile effector and regulatory cells in innate and adaptive immunity. *Eur J Immunol* 40: 1843-51
468. Moon TC, St Laurent CD, Morris KE, Marcet C, Yoshimura T, Sekar Y, Befus AD. 2010. Advances in mast cell biology: new understanding of heterogeneity and function. *Mucosal Immunol* 3: 111-28
469. Olivera A, Rivera J. 2011. An emerging role for the lipid mediator sphingosine-1-phosphate in mast cell effector function and allergic disease. *Adv Exp Med Biol* 716: 123-42
470. Allakhverdi Z, Smith DE, Comeau MR, Delespesse G. 2007. Cutting edge: The ST2 ligand IL-33 potently activates and drives maturation of human mast cells. *J Immunol* 179: 2051-4
471. Dougherty RH, Sidhu SS, Raman K, Solon M, Solberg OD, Caughey GH, Woodruff PG, Fahy JV. 2010. Accumulation of intraepithelial mast cells with a unique



- protease phenotype in T(H)2-high asthma. *J Allergy Clin Immunol* 125: 1046-53 e8
472. Balzar S, Fajt ML, Comhair SA, Erzurum SC, Bleecker E, Busse WW, Castro M, Gaston B, Israel E, Schwartz LB, Curran-Everett D, Moore CG, Wenzel SE. 2011. Mast cell phenotype, location, and activation in severe asthma. Data from the Severe Asthma Research Program. *Am J Respir Crit Care Med* 183: 299-309
  473. Carroll NG, Mutavdzic S, James AL. 2002. Distribution and degranulation of airway mast cells in normal and asthmatic subjects. *Eur Respir J* 19: 879-85
  474. Carroll NG, Mutavdzic S, James AL. 2002. Increased mast cells and neutrophils in submucosal mucous glands and mucus plugging in patients with asthma. *Thorax* 57: 677-82
  475. Yu M, Eckart MR, Morgan AA, Mukai K, Butte AJ, Tsai M, Galli SJ. 2011. Identification of an IFN-gamma/mast cell axis in a mouse model of chronic asthma. *J Clin Invest* 121: 3133-43
  476. Yu M, Tsai M, Tam SY, Jones C, Zehnder J, Galli SJ. 2006. Mast cells can promote the development of multiple features of chronic asthma in mice. *J Clin Invest* 116: 1633-41
  477. Kim S, Prout M, Ramshaw H, Lopez AF, LeGros G, Min B. 2010. Cutting edge: basophils are transiently recruited into the draining lymph nodes during helminth infection via IL-3, but infection-induced Th2 immunity can develop without basophil lymph node recruitment or IL-3. *J Immunol* 184: 1143-7
  478. Shen T, Kim S, Do JS, Wang L, Lantz C, Urban JF, Le Gros G, Min B. 2008. T cell-derived IL-3 plays key role in parasite infection-induced basophil production but is dispensable for in vivo basophil survival. *Int Immunol* 20: 1201-9
  479. Wakahara K, Van VQ, Baba N, Begin P, Rubio M, Delespesse G, Sarfati M. 2013. Basophils are recruited to inflamed lungs and exacerbate memory Th2 responses in mice and humans. *Allergy* 68: 180-9
  480. Macfarlane AJ, Kon OM, Smith SJ, Zeibecoglou K, Khan LN, Barata LT, McEuen AR, Buckley MG, Walls AF, Meng Q, Humbert M, Barnes NC, Robinson DS, Ying S, Kay AB. 2000. Basophils, eosinophils, and mast cells in atopic and nonatopic asthma and in late-phase allergic reactions in the lung and skin. *J Allergy Clin Immunol* 105: 99-107
  481. Ohnmacht C, Schwartz C, Panzer M, Schiedewitz I, Naumann R, Voehringer D. 2010. Basophils orchestrate chronic allergic dermatitis and protective immunity against helminths. *Immunity* 33: 364-74
  482. Sullivan BM, Liang HE, Bando JK, Wu D, Cheng LE, McKerrow JK, Allen CD, Locksley RM. 2011. Genetic analysis of basophil function in vivo. *Nat Immunol* 12: 527-35
  483. Hogan SP, Rosenberg HF, Moqbel R, Phipps S, Foster PS, Lacy P, Kay AB, Rothenberg ME. 2008. Eosinophils: biological properties and role in health and disease. *Clin Exp Allergy* 38: 709-50
  484. Kay AB. 2001. Allergy and allergic diseases. Second of two parts. *N Engl J Med* 344: 109-13
  485. Lemiere C, Ernst P, Olivenstein R, Yamauchi Y, Govindaraju K, Ludwig MS, Martin JG, Hamid Q. 2006. Airway inflammation assessed by invasive and noninvasive means in severe asthma: eosinophilic and noneosinophilic phenotypes. *J Allergy Clin Immunol* 118: 1033-9
  486. Sehmi R, Howie K, Sutherland DR, Schragge W, O'Byrne PM, Denburg JA. 1996. Increased levels of CD34+ hemopoietic progenitor cells in atopic subjects. *Am J Respir Cell Mol Biol* 15: 645-55
  487. Mattes J, Yang M, Mahalingam S, Kuehr J, Webb DC, Simson L, Hogan SP, Koskinen A, McKenzie AN, Dent LA, Rothenberg ME, Matthaei KI, Young IG, Foster PS. 2002. Intrinsic defect in T cell production of interleukin (IL)-13 in the absence of both

- IL-5 and eotaxin precludes the development of eosinophilia and airways hyperreactivity in experimental asthma. *J Exp Med* 195: 1433-44
488. Zimmermann N, Hershey GK, Foster PS, Rothenberg ME. 2003. Chemokines in asthma: cooperative interaction between chemokines and IL-13. *J Allergy Clin Immunol* 111: 227-42; quiz 43
  489. Kariyawasam HH, Robinson DS. 2006. The eosinophil: the cell and its weapons, the cytokines, its locations. *Semin Respir Crit Care Med* 27: 117-27
  490. Holgate ST. 2008. Pathogenesis of asthma. *Clin Exp Allergy* 38: 872-97
  491. Hogan SP, Matthaei KI, Young JM, Koskinen A, Young IG, Foster PS. 1998. A novel T cell-regulated mechanism modulating allergen-induced airways hyperreactivity in BALB/c mice independently of IL-4 and IL-5. *J Immunol* 161: 1501-9
  492. Humbles AA, Lloyd CM, McMillan SJ, Friend DS, Xanthou G, McKenna EE, Ghiran S, Gerard NP, Yu C, Orkin SH, Gerard C. 2004. A critical role for eosinophils in allergic airways remodeling. *Science* 305: 1776-9
  493. Foster PS, Hogan SP, Ramsay AJ, Matthaei KI, Young IG. 1996. Interleukin 5 deficiency abolishes eosinophilia, airways hyperreactivity, and lung damage in a mouse asthma model. *J Exp Med* 183: 195-201
  494. Walsh ER, Sahu N, Kearley J, Benjamin E, Kang BH, Humbles A, August A. 2008. Strain-specific requirement for eosinophils in the recruitment of T cells to the lung during the development of allergic asthma. *J Exp Med* 205: 1285-92
  495. Cox G. 1995. Glucocorticoid treatment inhibits apoptosis in human neutrophils. Separation of survival and activation outcomes. *J Immunol* 154: 4719-25
  496. Spits H, Artis D, Colonna M, Diefenbach A, Di Santo JP, Eberl G, Koyasu S, Locksley RM, McKenzie AN, Mebius RE, Powrie F, Vivier E. 2013. Innate lymphoid cells--a proposal for uniform nomenclature. *Nat Rev Immunol* 13: 145-9
  497. Hoyler T, Klose CS, Souabni A, Turqueti-Neves A, Pfeifer D, Rawlins EL, Voehringer D, Busslinger M, Diefenbach A. 2012. The transcription factor GATA-3 controls cell fate and maintenance of type 2 innate lymphoid cells. *Immunity* 37: 634-48
  498. Klein Wolterink RG, Serafini N, van Nimwegen M, Vosshenrich CA, de Bruijn MJ, Fonseca Pereira D, Veiga Fernandes H, Hendriks RW, Di Santo JP. 2013. Essential, dose-dependent role for the transcription factor Gata3 in the development of IL-5+ and IL-13+ type 2 innate lymphoid cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 110: 10240-5
  499. Spits H, Cupedo T. 2012. Innate lymphoid cells: emerging insights in development, lineage relationships, and function. *Annu Rev Immunol* 30: 647-75
  500. Moro K, Yamada T, Tanabe M, Takeuchi T, Ikawa T, Kawamoto H, Furusawa J, Ohtani M, Fujii H, Koyasu S. 2010. Innate production of T(H)2 cytokines by adipose tissue-associated c-Kit(+)Sca-1(+) lymphoid cells. *Nature* 463: 540-4
  501. Mjosberg JM, Trifari S, Crellin NK, Peters CP, van Drunen CM, Piet B, Fokkens WJ, Cupedo T, Spits H. 2011. Human IL-25- and IL-33-responsive type 2 innate lymphoid cells are defined by expression of CCR2 and CD161. *Nat Immunol* 12: 1055-62
  502. Barnig C, Cernadas M, Dutile S, Liu X, Perrella MA, Kazani S, Wechsler ME, Israel E, Levy BD. 2013. Lipoxin A4 regulates natural killer cell and type 2 innate lymphoid cell activation in asthma. *Sci Transl Med* 5: 174ra26
  503. Klein Wolterink RG, Kleinjan A, van Nimwegen M, Bergen I, de Bruijn M, Levani Y, Hendriks RW. 2012. Pulmonary innate lymphoid cells are major producers of IL-5 and IL-13 in murine models of allergic asthma. *Eur J Immunol* 42: 1106-16
  504. Fort MM, Cheung J, Yen D, Li J, Zurawski SM, Lo S, Menon S, Clifford T, Hunte B, Lesley R, Muchamuel T, Hurst SD, Zurawski G, Leach MW, Gorman DM, Rennick DM. 2001. IL-25 induces IL-4, IL-5, and IL-13 and Th2-associated pathologies in vivo. *Immunity* 15: 985-95

505. Halim TY, Krauss RH, Sun AC, Takei F. 2012. Lung natural helper cells are a critical source of Th2 cell-type cytokines in protease allergen-induced airway inflammation. *Immunity* 36: 451-63
506. Bentley AM, Menz G, Storz C, Robinson DS, Bradley B, Jeffery PK, Durham SR, Kay AB. 1992. Identification of T lymphocytes, macrophages, and activated eosinophils in the bronchial mucosa in intrinsic asthma. Relationship to symptoms and bronchial responsiveness. *Am Rev Respir Dis* 146: 500-6
507. Robinson DS, Hamid Q, Ying S, Tsicopoulos A, Barkans J, Bentley AM, Corrigan C, Durham SR, Kay AB. 1992. Predominant TH2-like bronchoalveolar T-lymphocyte population in atopic asthma. *N Engl J Med* 326: 298-304
508. Larche M, Robinson DS, Kay AB. 2003. The role of T lymphocytes in the pathogenesis of asthma. *J Allergy Clin Immunol* 111: 450-63; quiz 64
509. Jutel M, Pichler WJ, Skrbic D, Urwyler A, Dahinden C, Muller UR. 1995. Bee venom immunotherapy results in decrease of IL-4 and IL-5 and increase of IFN-gamma secretion in specific allergen-stimulated T cell cultures. *J Immunol* 154: 4187-94
510. Secrist H, Chelen CJ, Wen Y, Marshall JD, Umetsu DT. 1993. Allergen immunotherapy decreases interleukin 4 production in CD4+ T cells from allergic individuals. *J Exp Med* 178: 2123-30
511. Varney VA, Hamid QA, Gaga M, Ying S, Jacobson M, Frew AJ, Kay AB, Durham SR. 1993. Influence of grass pollen immunotherapy on cellular infiltration and cytokine mRNA expression during allergen-induced late-phase cutaneous responses. *J Clin Invest* 92: 644-51
512. Cohn L, Tepper JS, Bottomly K. 1998. IL-4-independent induction of airway hyperresponsiveness by Th2, but not Th1, cells. *J Immunol* 161: 3813-6
513. Rankin JA, Picarella DE, Geba GP, Temann UA, Prasad B, DiCosmo B, Tarallo A, Stripp B, Whitsett J, Flavell RA. 1996. Phenotypic and physiologic characterization of transgenic mice expressing interleukin 4 in the lung: lymphocytic and eosinophilic inflammation without airway hyperreactivity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93: 7821-5
514. Zhu Z, Homer RJ, Wang Z, Chen Q, Geba GP, Wang J, Zhang Y, Elias JA. 1999. Pulmonary expression of interleukin-13 causes inflammation, mucus hypersecretion, subepithelial fibrosis, physiologic abnormalities, and eotaxin production. *J Clin Invest* 103: 779-88
515. Lee JJ, McGarry MP, Farmer SC, Denzler KL, Larson KA, Carrigan PE, Brenneise IE, Horton MA, Haczku A, Gelfand EW, Leikauf GD, Lee NA. 1997. Interleukin-5 expression in the lung epithelium of transgenic mice leads to pulmonary changes pathognomonic of asthma. *J Exp Med* 185: 2143-56
516. Zhang DH, Yang L, Cohn L, Parkyn L, Homer R, Ray P, Ray A. 1999. Inhibition of allergic inflammation in a murine model of asthma by expression of a dominant-negative mutant of GATA-3. *Immunity* 11: 473-82
517. Mamessier E, Nieves A, Lorec AM, Dupuy P, Pinot D, Pinet C, Vervloet D, Magnan A. 2008. T-cell activation during exacerbations: a longitudinal study in refractory asthma. *Allergy* 63: 1202-10
518. Finotto S, Neurath MF, Glickman JN, Qin S, Lehr HA, Green FH, Ackerman K, Haley K, Galle PR, Szabo SJ, Drazen JM, De Sanctis GT, Glimcher LH. 2002. Development of spontaneous airway changes consistent with human asthma in mice lacking T-bet. *Science* 295: 336-8
519. Molet S, Hamid Q, Davoine F, Nutku E, Taha R, Page N, Olivenstein R, Elias J, Chakir J. 2001. IL-17 is increased in asthmatic airways and induces human bronchial fibroblasts to produce cytokines. *J Allergy Clin Immunol* 108: 430-8
520. Al-Ramli W, Prefontaine D, Chouiali F, Martin JG, Olivenstein R, Lemiere C, Hamid Q. 2009. T(H)17-associated cytokines (IL-17A and IL-17F) in severe asthma. *J Allergy Clin Immunol* 123: 1185-7



521. Pene J, Chevalier S, Preisser L, Venereau E, Guilleux MH, Ghannam S, Moles JP, Danger Y, Ravon E, Lesaux S, Yssel H, Gascan H. 2008. Chronically inflamed human tissues are infiltrated by highly differentiated Th17 lymphocytes. *J Immunol* 180: 7423-30
522. Wakashin H, Hirose K, Maezawa Y, Kagami S, Suto A, Watanabe N, Saito Y, Hatano M, Tokuhisa T, Iwakura Y, Puccetti P, Iwamoto I, Nakajima H. 2008. IL-23 and Th17 cells enhance Th2-cell-mediated eosinophilic airway inflammation in mice. *Am J Respir Crit Care Med* 178: 1023-32
523. McKinley L, Alcorn JF, Peterson A, Dupont RB, Kapadia S, Logar A, Henry A, Irvin CG, Piganeli JD, Ray A, Kolls JK. 2008. TH17 cells mediate steroid-resistant airway inflammation and airway hyperresponsiveness in mice. *J Immunol* 181: 4089-97
524. Wands JM, Roark CL, Aydintug MK, Jin N, Hahn YS, Cook L, Yin X, Dal Porto J, Lahn M, Hyde DM, Gelfand EW, Mason RJ, O'Brien RL, Born WK. 2005. Distribution and leukocyte contacts of gammadelta T cells in the lung. *J Leukoc Biol* 78: 1086-96
525. Spinozzi F, Agea E, Bistoni O, Forenza N, Monaco A, Bassotti G, Nicoletti I, Riccardi C, Grignani F, Bertotto A. 1996. Increased allergen-specific, steroid-sensitive gamma delta T cells in bronchoalveolar lavage fluid from patients with asthma. *Ann Intern Med* 124: 223-7
526. Lahn M, Kanehiro A, Takeda K, Terry J, Hahn YS, Aydintug MK, Konowal A, Ikuta K, O'Brien RL, Gelfand EW, Born WK. 2002. MHC class I-dependent Vgamma4+ pulmonary T cells regulate alpha beta T cell-independent airway responsiveness. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99: 8850-5
527. Hahn YS, Taube C, Jin N, Takeda K, Park JW, Wands JM, Aydintug MK, Roark CL, Lahn M, O'Brien RL, Gelfand EW, Born WK. 2003. V gamma 4+ gamma delta T cells regulate airway hyperreactivity to methacholine in ovalbumin-sensitized and challenged mice. *J Immunol* 171: 3170-8
528. Murdoch JR, Lloyd CM. 2010. Resolution of allergic airway inflammation and airway hyperreactivity is mediated by IL-17-producing {gamma}{delta}T cells. *Am J Respir Crit Care Med* 182: 464-76
529. Reynolds C, Barkans J, Clark P, Kariyawasam H, Altmann D, Kay B, Boyton R. 2009. Natural killer T cells in bronchial biopsies from human allergen challenge model of allergic asthma. *J Allergy Clin Immunol* 124: 860-2; author reply 2
530. Matangkasombut P, Marigowda G, Ervine A, Idris L, Pichavant M, Kim HY, Yasumi T, Wilson SB, DeKruyff RH, Faul JL, Israel E, Akbari O, Umetsu DT. 2009. Natural killer T cells in the lungs of patients with asthma. *J Allergy Clin Immunol* 123: 1181-5
531. Nagata Y, Kamijuku H, Taniguchi M, Ziegler S, Seino K. 2007. Differential role of thymic stromal lymphopoietin in the induction of airway hyperreactivity and Th2 immune response in antigen-induced asthma with respect to natural killer T cell function. *Int Arch Allergy Immunol* 144: 305-14
532. Akbari O, Stock P, Meyer E, Kronenberg M, Sidobre S, Nakayama T, Taniguchi M, Grusby MJ, DeKruyff RH, Umetsu DT. 2003. Essential role of NKT cells producing IL-4 and IL-13 in the development of allergen-induced airway hyperreactivity. *Nat Med* 9: 582-8
533. Licona-Limon P, Kim LK, Palm NW, Flavell RA. 2013. TH2, allergy and group 2 innate lymphoid cells. *Nat Immunol* 14: 536-42
534. Ling EM, Smith T, Nguyen XD, Pridgeon C, Dallman M, Arbery J, Carr VA, Robinson DS. 2004. Relation of CD4+CD25+ regulatory T-cell suppression of allergen-driven T-cell activation to atopic status and expression of allergic disease. *Lancet* 363: 608-15
535. Lewkowich IP, Herman NS, Schleifer KW, Dance MP, Chen BL, Dienger KM, Sproles AA, Shah JS, Kohl J, Belkaid Y, Wills-Karp M. 2005. CD4+CD25+ T cells

- protect against experimentally induced asthma and alter pulmonary dendritic cell phenotype and function. *J Exp Med* 202: 1549-61
536. Kearley J, Barker JE, Robinson DS, Lloyd CM. 2005. Resolution of airway inflammation and hyperreactivity after in vivo transfer of CD4+CD25+ regulatory T cells is interleukin 10 dependent. *J Exp Med* 202: 1539-47
  537. Rubtsov YP, Rasmussen JP, Chi EY, Fontenot J, Castelli L, Ye X, Treuting P, Siewe L, Roers A, Henderson WR, Jr., Muller W, Rudensky AY. 2008. Regulatory T cell-derived interleukin-10 limits inflammation at environmental interfaces. *Immunity* 28: 546-58
  538. Wu K, Bi Y, Sun K, Wang C. 2007. IL-10-producing type 1 regulatory T cells and allergy. *Cell Mol Immunol* 4: 269-75
  539. Taylor A, Verhagen J, Blaser K, Akdis M, Akdis CA. 2006. Mechanisms of immune suppression by interleukin-10 and transforming growth factor-beta: the role of T regulatory cells. *Immunology* 117: 433-42
  540. Oh JW, Seroogy CM, Meyer EH, Akbari O, Berry G, Fathman CG, Dekruyff RH, Umetsu DT. 2002. CD4 T-helper cells engineered to produce IL-10 prevent allergen-induced airway hyperreactivity and inflammation. *J Allergy Clin Immunol* 110: 460-8
  541. Sedgwick JD, Holt PG. 1984. Suppression of IgE responses in inbred rats by repeated respiratory tract exposure to antigen: responder phenotype influences isotype specificity of induced tolerance. *Eur J Immunol* 14: 893-7
  542. Betts RJ, Kemeny DM. 2009. CD8+ T cells in asthma: friend or foe? *Pharmacol Ther* 121: 123-31
  543. Laberge S, Wu L, Olivenstein R, Xu LJ, Renzi PM, Martin JG. 1996. Depletion of CD8+ T cells enhances pulmonary inflammation but not airway responsiveness after antigen challenge in rats. *J Allergy Clin Immunol* 98: 617-27
  544. Isogai S, Jedrzkiewicz S, Taha R, Hamid Q, Martin JG. 2005. Resident CD8+ T cells suppress CD4+ T cell-dependent late allergic airway responses. *J Allergy Clin Immunol* 115: 521-6
  545. Stock P, Kallinich T, Akbari O, Quarcoo D, Gerhold K, Wahn U, Umetsu DT, Hamelmann E. 2004. CD8(+) T cells regulate immune responses in a murine model of allergen-induced sensitization and airway inflammation. *Eur J Immunol* 34: 1817-27
  546. Hamelmann E, Oshiba A, Paluh J, Bradley K, Loader J, Potter TA, Larsen GL, Gelfand EW. 1996. Requirement for CD8+ T cells in the development of airway hyperresponsiveness in a murine model of airway sensitization. *J Exp Med* 183: 1719-29
  547. Miyahara N, Takeda K, Kodama T, Joetham A, Taube C, Park JW, Miyahara S, Balhorn A, Dakhama A, Gelfand EW. 2004. Contribution of antigen-primed CD8+ T cells to the development of airway hyperresponsiveness and inflammation is associated with IL-13. *J Immunol* 172: 2549-58
  548. Isogai S, Taha R, Tamaoka M, Yoshizawa Y, Hamid Q, Martin JG. 2004. CD8+ alphabeta T cells can mediate late airway responses and airway eosinophilia in rats. *J Allergy Clin Immunol* 114: 1345-52
  549. Koya T, Miyahara N, Takeda K, Matsubara S, Matsuda H, Swasey C, Balhorn A, Dakhama A, Gelfand EW. 2007. CD8+ T cell-mediated airway hyperresponsiveness and inflammation is dependent on CD4+IL-4+ T cells. *J Immunol* 179: 2787-96
  550. Sawicka E, Noble A, Walker C, Kemeny DM. 2004. Tc2 cells respond to soluble antigen in the respiratory tract and induce lung eosinophilia and bronchial hyperresponsiveness. *Eur J Immunol* 34: 2599-608

551. Takeda K, Haczku A, Lee JJ, Irvin CG, Gelfand EW. 2001. Strain dependence of airway hyperresponsiveness reflects differences in eosinophil localization in the lung. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 281: L394-402
552. Smith TR, Kumar V. 2008. Revival of CD8+ Treg-mediated suppression. *Trends Immunol* 29: 337-42
553. Malchow S, Leventhal DS, Nishi S, Fischer BI, Shen L, Paner GP, Amit AS, Kang C, Geddes JE, Allison JP, Socci ND, Savage PA. 2013. Aire-dependent thymic development of tumor-associated regulatory T cells. *Science* 339: 1219-24
554. Moore KW, de Waal Malefyt R, Coffman RL, O'Garra A. 2001. Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor. *Annu Rev Immunol* 19: 683-765
555. Sanjabi S, Zenewicz LA, Kamanaka M, Flavell RA. 2009. Anti-inflammatory and pro-inflammatory roles of TGF-beta, IL-10, and IL-22 in immunity and autoimmunity. *Curr Opin Pharmacol* 9: 447-53
556. Jeannin P, Lecoanet S, Delneste Y, Gauchat JF, Bonnefoy JY. 1998. IgE versus IgG4 production can be differentially regulated by IL-10. *J Immunol* 160: 3555-61
557. Nouri-Aria KT, Wachholz PA, Francis JN, Jacobson MR, Walker SM, Wilcock LK, Staple SQ, Aalberse RC, Till SJ, Durham SR. 2004. Grass pollen immunotherapy induces mucosal and peripheral IL-10 responses and blocking IgG activity. *J Immunol* 172: 3252-9
558. Royer B, Varadaradjalou S, Saas P, Guillosson JJ, Kantelip JP, Arock M. 2001. Inhibition of IgE-induced activation of human mast cells by IL-10. *Clin Exp Allergy* 31: 694-704
559. Takanashi S, Nonaka R, Xing Z, O'Byrne P, Dolovich J, Jordana M. 1994. Interleukin 10 inhibits lipopolysaccharide-induced survival and cytokine production by human peripheral blood eosinophils. *J Exp Med* 180: 711-5
560. Caux C, Massacrier C, Vanbervliet B, Barthelemy C, Liu YJ, Banchereau J. 1994. Interleukin 10 inhibits T cell alloreaction induced by human dendritic cells. *Int Immunol* 6: 1177-85
561. de Waal Malefyt R, Haanen J, Spits H, Roncarolo MG, te Velde A, Figdor C, Johnson K, Kastelein R, Yssel H, de Vries JE. 1991. Interleukin 10 (IL-10) and viral IL-10 strongly reduce antigen-specific human T cell proliferation by diminishing the antigen-presenting capacity of monocytes via downregulation of class II major histocompatibility complex expression. *J Exp Med* 174: 915-24
562. Enk AH, Angeloni VL, Udey MC, Katz SI. 1993. Inhibition of Langerhans cell antigen-presenting function by IL-10. A role for IL-10 in induction of tolerance. *J Immunol* 151: 2390-8
563. Fiorentino DF, Zlotnik A, Vieira P, Mosmann TR, Howard M, Moore KW, O'Garra A. 1991. IL-10 acts on the antigen-presenting cell to inhibit cytokine production by Th1 cells. *J Immunol* 146: 3444-51
564. Morel AS, Quarantino S, Douek DC, Londei M. 1997. Split activity of interleukin-10 on antigen capture and antigen presentation by human dendritic cells: definition of a maturative step. *Eur J Immunol* 27: 26-34
565. Pils MC, Pisano F, Fasnacht N, Heinrich JM, Groebe L, Schippers A, Rozell B, Jack RS, Muller W. 2010. Monocytes/macrophages and/or neutrophils are the target of IL-10 in the LPS endotoxemia model. *Eur J Immunol* 40: 443-8
566. Shah N, Kammermeier J, Elawad M, Glocker EO. 2012. Interleukin-10 and interleukin-10-receptor defects in inflammatory bowel disease. *Curr Allergy Asthma Rep* 12: 373-9
567. Kuhn R, Lohler J, Rennick D, Rajewsky K, Muller W. 1993. Interleukin-10-deficient mice develop chronic enterocolitis. *Cell* 75: 263-74
568. Franke A, Balschun T, Karlsen TH, Sventoraityte J, Nikolaus S, Mayr G, Domingues FS, Albrecht M, Nothnagel M, Ellinghaus D, Sina C, Onnie CM, Weersma RK, Stokkers PC, Wijmenga C, Gazouli M, Strachan D, McArdle WL, Vermeire S,

- Rutgeerts P, Rosenstiel P, Krawczak M, Vatn MH, group Is, Mathew CG, Schreiber S. 2008. Sequence variants in IL10, ARPC2 and multiple other loci contribute to ulcerative colitis susceptibility. *Nat Genet* 40: 1319-23
569. Roers A, Siewe L, Strittmatter E, Deckert M, Schluter D, Stenzel W, Gruber AD, Krieg T, Rajewsky K, Muller W. 2004. T cell-specific inactivation of the interleukin 10 gene in mice results in enhanced T cell responses but normal innate responses to lipopolysaccharide or skin irritation. *J Exp Med* 200: 1289-97
570. Brimnes J, Allez M, Dotan I, Shao L, Nakazawa A, Mayer L. 2005. Defects in CD8+ regulatory T cells in the lamina propria of patients with inflammatory bowel disease. *J Immunol* 174: 5814-22
571. Kamanaka M, Kim ST, Wan YY, Sutterwala FS, Lara-Tejero M, Galan JE, Harhaj E, Flavell RA. 2006. Expression of interleukin-10 in intestinal lymphocytes detected by an interleukin-10 reporter knockin tiger mouse. *Immunity* 25: 941-52
572. Kullberg MC, Ward JM, Gorelick PL, Caspar P, Hieny S, Cheever A, Jankovic D, Sher A. 1998. Helicobacter hepaticus triggers colitis in specific-pathogen-free interleukin-10 (IL-10)-deficient mice through an IL-12- and gamma interferon-dependent mechanism. *Infect Immun* 66: 5157-66
573. Azhar M, Yin M, Bommireddy R, Duffy JJ, Yang J, Pawlowski SA, Boivin GP, Engle SJ, Sanford LP, Grisham C, Singh RR, Babcock GF, Doetschman T. 2009. Generation of mice with a conditional allele for transforming growth factor beta 1 gene. *Genesis* 47: 423-31



**Yirajen Vuddamalay**

**CD8<sup>+</sup>CD28<sup>low</sup> regulatory T cells:  
Differentiation and function in allergic asthma**

PhD supervisor: Prof. Joost van Meerwijk

Toulouse, 21<sup>st</sup> November 2014

Regulatory T cells (Treg) play a central role in the control immune responses. Their multifaceted action contributes to the maintenance of immune self-tolerance and homeostasis. Expression of the CD8 co-receptor and low levels of the co-stimulatory molecule CD28 characterizes one of the several Treg populations identified. CD8<sup>+</sup>CD28<sup>low</sup> Treg from mice exert suppressive function *in vitro* and control experimental immunopathology *in vivo*. However the origin and physiological role of these cells have remained unclear up till now.

Treg can either develop in the thymus from bone-marrow-derived hematopoietic precursors or differentiate from the pool of conventional T cells in the periphery. Depending on their origin, Treg play distinct roles in immune responses. We have demonstrated that in mouse, functional CD8<sup>+</sup>CD28<sup>low</sup> Treg are present in the thymus and that these cells develop locally and are not recirculating from the periphery. We also identified a homologous naïve CD8<sup>+</sup>CD28<sup>low</sup> T cell population with immunosuppressive properties in human peripheral blood and thymus.

We then evaluated the physiological relevance of CD8<sup>+</sup>CD28<sup>low</sup> Treg in the control of immune responses. We used a conditional knockout approach to generate mice bearing specific ablation of IL-10, a key molecule involved in the maintenance of immune homeostasis at mucosal surfaces, in CD8<sup>+</sup> T cells. In an experimental model of asthma, these mice developed exaggerated airway inflammation demonstrating the role of one or several IL10-producing CD8<sup>+</sup> Treg populations in the control of airway responses. Importantly, adoptive transfer of IL10-proficient CD8<sup>+</sup>CD28<sup>low</sup> Treg was sufficient to restrain the allergic reaction.

Investigating the relevance of thymus-derived CD8<sup>+</sup>CD28<sup>low</sup> Treg in immune-mediated pathologies will eventually lead to a better comprehension of the physiological role of these cells and possible cell-based therapeutics.

**Key words :** CD8<sup>+</sup> regulatory T cells, Development, Physiological role

**Field:** Immunology

Tolerance and Autoimmunity Team

INSERM UMR 1043 Centre de Physiopathologie de Toulouse Purpan

BP 3028 31024 Toulouse Cedex 3



**Yirajen Vuddamalay**

**Lymphocytes T régulateurs CD8<sup>+</sup>CD28<sup>low</sup> :  
Différenciation et fonction dans l'asthme allergique**

Directeur de thèse : Prof. Joost van Meerwijk

Toulouse, le 21 novembre 2014

Les lymphocytes T régulateurs (Treg) jouent un rôle essentiel dans le contrôle des réponses immunitaires. A travers différents mécanismes effecteurs, les Treg contribuent au maintien de l'homéostasie immunitaire et à la *tolérance* au soi. Plusieurs populations de Treg ont été identifiées, dont celle qui est caractérisée par l'expression du co-récepteur CD8 et de faibles niveaux de la molécule de co-stimulation CD28. Les Treg CD8<sup>+</sup>CD28<sup>low</sup> murins ont une capacité suppressive *in vitro* et préviennent l'immunopathologie dans différents modèles expérimentaux *in vivo*. Cependant l'origine et le rôle physiologique de ces cellules restent à ce jour inconnu. Les Treg peuvent soit se développer en tant que lignage distinct dans le thymus à partir de précurseurs hématopoïétiques issus de la moelle osseuse soit se différencier à partir du pool de lymphocytes T conventionnelles en périphérie. Selon leur origine, les Treg exercent des fonctions distinctes lors des réponses immunitaires. Ici nous démontrons que des Treg CD8<sup>+</sup>CD28<sup>low</sup> fonctionnels sont présents dans le thymus de la souris et que ces cellules se développent *de novo* dans cet organe et ne recirculent pas de la périphérie. Nous présentons également l'identification, dans le sang et le thymus humain, une population homologue de lymphocytes T CD8<sup>+</sup>CD28<sup>low</sup> naïfs pourvue d'une capacité immunosuppressive.

Nous avons évalué l'implication des Treg CD8<sup>+</sup>CD28<sup>low</sup> dans le contrôle des réponses immunitaires. Nous avons généré des souris présentant une ablation spécifique de l'IL-10, une molécule cruciale au maintien de l'homéostasie immunitaire au niveau des muqueuses, dans les lymphocytes T CD8<sup>+</sup>. Dans un modèle expérimental d'asthme allergique, ces souris développent une inflammation pulmonaire accrue démontrant le rôle d'un ou plusieurs populations de Treg CD8<sup>+</sup> producteurs d'IL-10 dans le contrôle des réponses immunitaires au niveau des voies aériennes. Le transfert adoptif de Treg CD8<sup>+</sup>CD28<sup>low</sup> issus de souris sauvages suffit à restreindre la réponse allergique.

En conclusion, nos données mettent en évidence l'origine thymique des Treg CD8<sup>+</sup>CD28<sup>low</sup> et démontrent leur implication dans le maintien de l'homéostasie immunitaire au niveau des poumons. L'évaluation du rôle des Treg CD8<sup>+</sup>CD28<sup>low</sup> dans l'immunopathologie apportera une meilleure compréhension de la fonction physiologique de ces cellules et contribuera ultérieurement au développement de thérapies utilisant ou ciblant ces cellules.

**Mot clés :** Lymphocytes T régulateurs CD8<sup>+</sup>, Développement, Rôle Physiologique

**Discipline :** Immunologie

Equipe Tolérance et Auto-immunité

INSERM UMR 1043 Centre de Physiopathologie de Toulouse Purpan

BP 3028 31024 Toulouse Cedex 3